

Aus dem Max von Pettenkoffer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Koszinowski

**Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern
gegen Hepatitis E Virus
in Seren von Blutspendern, Schlachthauspersonal,
Schweinezüchtern und Schlachtschweinen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Asimula Siochu

aus

Karion/Thesprotia/Griechenland

Jahr 2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G.G. Frösner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. Adelhard

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 03. 2003

Gewidmet:

*meinen Eltern
meiner Schwester Anna
und
meinem lieben Sohn Fotis*

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. Einleitung	4
1.1 Virushepatitiden	4
1.1.2 Hepatitis A	10
1.1.3 Hepatitis B	11
1.1.4 Hepatitis C	13
1.1.5 Hepatitis D	14
2. Hepatitis E	16
2.1 Geschichte der Hepatitis E Forschung	16
2.2.1 Das HEV-Virus	21
2.2.2 Das HEV-Genom	23
2.2.3 HEV- Replikation	26
2.2.4 HEV-Gruppen und Isolate	27
2.2.5 Krankheitsbild und Übertragung	30
2.2.6 Vorbeugung und Impfung	33
3. Diagnose	35
3.1 Nachweismethoden für die Diagnose der Hepatitis E	36
3.1.1 ELISA (<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay)	36
3.1.2 PCR	37
3.1.3 Western Blot	37
3.2 Verfügbare Nachweismethoden für Hepatitis E und deren Aussagekraft	39
3.2.1 Antikörper gegen Hepatitis E Virus (Anti-HEV)	40
3.2.2 IgM Antikörper gegen HEV	40
3.2.3 Nachweis von HEV-RNS mittels PCR	41
3.2.4 Bestätigung Anti-HEV-positiver Befunde mittels Western Blot	41
3.2.5 Diagnostische Anwendung der Sequenzvariation des HEV-RNS	42
3.3 Untersuchungsgang bei der Diagnose der akuten und abgelaufenen Hepatitis	43
3.3.1 Akute Hepatitis E	43
3.3.2 Abgelaufene Hepatitis E	43

4.	Ein Überblick der Studien über HEV-Isolate, Schwein-Isolate und ihre Beziehungen	45
5.	Material und Methodik	57
5.1	Charakterisierung des Untersuchungsmaterials	57
5.2	Untersuchungsmethode	59
5.2.1	Testprinzip	59
5.2.2	Testdurchführung	61
5.2.3	Auswertung	64
6.	Ergebnisse	67
6.1	Vergleich der Gruppen	67
6.1.1	Anti-HEV Prävalenz unter den Blutspendern, dem Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern	67
6.1.2	Häufigkeit der einzelnen ORF Banden bei Western-Blot-positiven Blutspendern, Schlacht-hauspersonal und Schweinezüchtern	67
6.2	Prävalenz Anti-HEV in den Schweinen und Vergleich zur Prävalenz in Gruppen der Wohnbevölkerung	70
6.2.1	Anti-HEV Prävalenz bei den untersuchten Schweineseren	70
6.2.2	Häufigkeit des Nachweises einzelner Banden bei Schweinen mit positivem Western Blot	71
6.3	Altersverteilung	73
6.3.1	Altersverteilung Anti-HEV-positiver Befunde beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern	73
6.4	Berufsjahreverteilung	75
6.4.1	Berufsjahreverteilung bei Anti-HEV positivem Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern	75
6.5	Häufigkeit von Antikörpern gegen die recombinant hergestellten HEV-Teilproteine im Western Blot	77
6.6	Angaben zur Statischen Auswertung	80
7.	Diskussion	82
8.	Zusammenfassung	89
9.	Literatur	91

Abkürzungsverzeichnis	110
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	112
Danksagung	115
Lebenslauf	117

1. EINLEITUNG

Der Begriff Hepatitis umfaßt alle hepatozellulären Erkrankungen, die eine Entzündung der Leber zur Folge haben. Die Entzündung geht mit einer Erhöhung der leberspezifischen Enzyme im Serum hervor und/oder einen Ikterus. Viren, Bakterien, Protozoen, Parasiten, toxische Substanzen, Arzneimittel, Alkoholkonsum können eine Hepatitis hervorrufen. Unter den Hepatitiden machen die Virushepatitiden mit 90% den weitaus größten Anteil aus und gehören somit zu den wichtigsten Infektionskrankheiten der Welt. Die Virushepatitiden stellen die häufigste Lebererkrankung weltweit dar.

1.1 Virushepatitiden

Virushepatitiden gibt es seit jeher. Hippokrates kam als erster zu dem Erkenntnis, daß es eine übertragbare Form von Gelbsucht gäbe (NOLTE et al. 1978). Im 8. Jahrhundert vermutete Papst Zacharias, daß Gelbsucht „kontagiös“ sei und schlug deshalb eine Isolierung dieser Patienten vor. Von HERLITZ in Göttingen stammt der Begriff von „icterus epidemicus“ im Jahre 1791. Insbesondere in Kriegszeiten wurde immer wieder ein epidemieartiges Auftreten von Ikterus beobachtet (WIESE et al. 1991). Im letzten Jahrhundert gab es viele Berichte über Gelbsuchtepidemien. FROELICH diskutiert in seiner Arbeit im Jahre 1879 „über Icterusepidemien“ die Wahrscheinlichkeit eines infektiösen Agens für eine der 30 von ihm berichteten Epidemien.

Für VIRCHOW handelte es sich beim „Icterus catarrhalis“ um einen hepatischen Ikterus der angeblich durch einen Schleimpfropf in der Einmündung der Vaterschen Papille zustande käme.

Vor etwa hundert Jahren beschrieben LUERMAN und JEHN (1883) je eine Ikterusepidemie so genau, so daß diese Beschreibung als Erstbeschreibung der heute als Hepatitis B bezeichneten Krankheit gelten kann. Nach einer Pockenimpfung von

Arbeitern waren Gelbsuchtepidemien aufgetreten und es wurden lange Inkubationszeiten von acht Wochen bis acht Monaten beschrieben. Fast alle Patienten, mit nur wenigen Ausnahmen, haben trotz Gewichtsverlust und Ikterus weiter gearbeitet.

EPPINGER bestritt, daß es sich beim katarrhalischen Ikterus um eine Infektionskrankheit handelt, obwohl er 1922 das pathologisch-anatomische Bild der Hepatitis genau beschrieb anhand von Autopsiebefunden, die er bei befallenen Soldaten erhoben hatte, die trotz ihrer Gelbsucht im Einsatz waren. Er war der Meinung, daß die Hepatitis durch Gifte, Bakterien oder Nahrungsmittelzersetzung hervorgerufen würde.

Exakte Beschreibungen der Hepatitis-Erkrankung geliefert von skandinavischen Autoren 1925 und 1942 wurden nicht genügend beachtet.

Unmittelbar nach dem zweiten Weltkrieg wurden zwei Arten von Hepatitis benannt. Die „Hepatitis epidemica“ oder „infektiöse Hepatitis“ mit oralem Übertragungsweg und der „Homologe-Serum-Ikterus“ oder „Inokulationshepatitis“ vorwiegend parenteral übertragen durch nicht ausreichend sterilisierte Spritzen, Blutübertragungen und Impfungen.

Als erster bewies VOEGT 1941 die Übertragbarkeit eines infektiösen Agens für die Hepatitis epidemica im Versuch an sich selbst und an drei Medizinstudenten. Sie schluckten Duodenalsaft von einem an Hepatitis epidemica erkrankten Patienten. Zwei von ihnen bekamen danach eine leichte Gelbsucht. 1942 beschrieb auch Mac CALLUM die Übertragbarkeit eines infektiösen Agens.

5 Jahre später schlug Mac CALLUM die Bezeichnung „Hepatitis A“ für die Hepatitis epidemica und „Hepatitis B“ für die Inokulationshepatitis vor.

Anhand systematischen epidemiologischen Untersuchungen schlug KRUGMAN 1967 vor, daß es sich bei der Virushepatitis um mindestens zwei verschiedene Erkrankungen handeln muß mit zwei Erregern, die er MS 1 (HAV) und MS 2 (HBV) nannte. Er stellte fest, daß beide Infektionen keine gekreuzte Immunität hinterließen und, daß sie unterschiedliche Inkubationsraten hatten.

Hinweise auf die Möglichkeit einer Übertragung des HBV durch engen körperlichen Kontakt waren immer wieder gegeben, konnten aber nicht gedeutet werden. MOSLEY wies als erster auf die Möglichkeit der venerischen Übertragung hin.

Der entscheidende Durchbruch bei der Suche nach dem Virus oder den Viren kam mit der zufälligen Entdeckung eines Antigens durch BLUMBERG im Jahre 1965. Beim Untersuchen von Seren von polytransfunden Patienten mit der Ouchterlony-Technik fand er heraus, daß zwei Seren von vielfach-transfunden Haemophilen eine Präzipitationslinie mit einem von 24 Seren verschiedener Herkunft enthielten. Dieses Serum stammte von einem australischen Ureinwohner, daher auch die Bezeichnung dieses neu entdeckten Antigens als „Australia Antigen“, später HbsAg oder Oberflächenantigen. Zunächst wurde ein Zusammenhang mit Leukämie vermutet. 1968 stellte Prince den Zusammenhang mit der Hepatitis B Infektion sicher, womit die serologische Diagnostik ihrem Anfang nahm.

Etwa zur selben Zeit ist es DEINHARDT gelungen ein Hepatitisvirus auf Krallenaffen, Marmosets, zu übertragen. Damit war ein entscheidender Schritt getan, der es ermöglichte nunmehr Übertragungen der Viren auf Versuchstiere zu übertragen.

Von da an nahm die Hepatitisforschung einen enormen Aufschwung. DANE gelang der elektronenoptische Nachweis des kompletten HBV, daher auch die Bezeichnung „Dane-Partikel“, JUNE ALMEIDA beschrieb die Besonderheiten des HBV mit Oberflächenantigenen und Kern, BOUVIER entdeckte die Serotypen, MAGNIUS entdeckte das e-Antigen, FEINSTONE und KIPKIAN stellten unter Anwendung einer Immunfluoreszenz-elektronenmikroskopischen Methode das HAV dar.

Nachdem trotz des Ausschlusses von HBsAg-positiven Blutspendern Posttransfusions-Hepatitis auftraten, schlug FEINSTONE 1975 die Existenz eines weiteren Erregers (NonA-NonB) vor, das im gleichen Jahr von VILLEREGOS die Bezeichnung „Hepatitis C Virus“ erhielt. Im Jahre 1977 entdeckte RIZETTO das delta-Antigen bei einem Patienten mit Hepatitis B Infektion. Dieses Antigen das zu seiner Replikation die Hülle des HBV benötigt wurde als Hepatitis D Virus bezeichnet.

PROVOST isolierte das Hepatitis A Virus in Gewebekulturen im Jahr 1985. Erst 10 Jahre nach der Hypothese über die Existenz eines NANB-Virus wurden mehrere Viren für das Krankheitsbild der NANB-Hepatitis verantwortlich gemacht. Ein Virus, das durch Bluttransfusionen übertragen wird. Ein durch Koagulations-Faktor-Konzentrate, Anti-Hämophilie Faktor VIII und Faktor IX-Komplexen übertragbares

Virus. Ein Virus das als Verursacher der sogenannten „epidemic waterborne NANB hepatitis“ verantwortlich gemacht wurde.

Im Jahre 1989 gelang CHOO die Identifizierung des Hepatitis C Virus.

Jahre nach einer großen Hepatitis-Epidemie in Neu-Delhi/Indien im Jahre 1955 wurde die Existenz eines noch ungekannten Erregers vermutet. Die Mehrzahl der Personen, die von diesen unbekannten Erreger betroffen waren, war lange vor der Epidemie an einer Hepatitis A erkrankt. 1980 bestätigte WONG durch retrospektive serologische Untersuchungen, daß diese Hepatitis eine enteral übertragene NANB-Hepatitis sein mußte. Die fäkal-orale Übertragung des verantwortlichen Virus dieser Epidemie ist experimentell von BALAYAN im Jahre 1982 nachgewiesen worden.

ARANKALLE entdeckte 5 Jahre später in Stuhlproben eines indischen Patienten virusartige Partikel von etwa 27 nm Durchmesser. Diese Partikel wurden als Krankheitsverursacher sowohl von zwei Epidemien als auch für die Erkrankung eines Patienten aus Taschkent, Rußland, verantwortlich gemacht.

GUPTA beschrieb im gleichen Jahr Viruspartikel von gleicher Größe, die er in Stuhlproben von Patienten, die an epidemische virale Hepatitis erkrankten, entdeckt hatte. Nur wenige Jahre später, 1990, erfolgte der Durchbruch in der Charakterisierung dieses als Hepatitis E Virus benannten Virus. REYES beschrieb die physiko-chemischen und ultrastrukturellen Eigenschaften des Hepatitis E Virus. Ein Jahr danach, 1991, gelang BRANDLEY die Klonierung und Sequenzierung des Virus. TAM ist die Kartographierung des HEV-Genoms gelungen.

Unter den Hepatitiden nehmen die Virushepatitiden mit 90% den weitaus größten Anteil ein. Somit gehören sie zu den wichtigsten Infektionskrankheiten der Welt.

Neben den bekannten und oben erwähnten primär hepatotropen Viren (Hepatitis A bis E) gibt es auch weitere weniger bekannte Viruserkrankungen, die zu einer Erkrankung der Leber führen können (DOBLER /FROESNER et al. 2001).

Es werden 3 Arten von viralen, nicht primär hepatotropen Virushepatitiden unterschieden.

Die erste Gruppe umfaßt Viruserkrankungen die im Zuge einer Mitbeteiligung verschiedener Organsysteme auch die Leber betreffen. Steht die Symptomatik anderer Organsysteme im Vordergrund und wird eine Erhöhung der Leberspezifischen Transaminasen festgestellt, so spricht man von Begleithepatitis.

Die zweite Gruppe von Viren ruft bei Personen mit Grunderkrankungen oder besonderen immunologischen Gegebenheiten Hepatitiden hervor. Diese Gruppe von Erregern sollte bei Patienten mit entsprechenden Grunderkrankungen in die Differentialdiagnose einbezogen werden.

Die dritte Gruppe von Viren sind meistens tropische Viren, die als Ursache einer Hepatitis beim Menschen auftreten können, die unter der Symptomatik einer Hepatitis oder Begleithepatitis mit Beteiligung anderer Organe auftreten. Sie sollten bei entsprechender Reiseanamnese in Betracht gezogen werden.

Tabelle 1.1.1: Infektionsbedingte, nicht-virale Hepatitis-Ursachen
(nach DOBLER/FROESNER)

Protozoen	Malaria, Schistosomiasis, Leishmaniose
Bakterien	Q-Fieber, Syphilis, Melioidosis, Tularaemie, Rückfallfieber, Fleckfieber, Leptospirose
Pilze	Histoplasmose, Aspergillose

Aus epidemiologischer Sicht können unterschiedliche Faktoren zur Verbreitung der viralen Hepatitiden führen. Diese können unter anderem sein: das Vorkommen in Abhängigkeit von der geographischen Lage, die hygienischen Bedingungen, der Kontakt mit Blut und Blutprodukten, wie z.B. bei Operationen, Blutübertragungen, Hämodialyse, i.v. Drogenkonsum, sexuelle Kontakte, sowie der Kontakt innerhalb der Familie und des Berufes.

Die Virushepatitiden sind vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten weit verbreitet und hängen eng mit schlechten hygienischen Verhältnissen zusammen. Aber auch in den Industrieländern spielen Virushepatitiden eine sehr große Rolle da eine große Zahl von Personen betroffen werden.

Bis heute sind fünf Hepatitis-Viren gut charakterisiert worden

- Hepatitis A
- Hepatitis B
- Hepatitis C
- Hepatitis D
- Hepatitis E

Weitere potentielle Hepatitis-Erreger könnten die Hepatitisskala noch erweitern. An dieser Stelle sei erwähnt, daß für das als Hepatitis G bezeichnetes Virus inzwischen keine ernstzunehmende Hinweise mehr gibt, ob es dieses hepatotrop sei und deshalb wird auf dieses nicht näher eingegangen.

Diese fünf Hepatitis Viren unterscheiden sie sich in der Morphologie, in ihren physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften. Diese Eigenschaften haben eine unterschiedliche Epidemiologie zu Folge.

Nach ihren Übertragungsweg werden die Hepatitiden in zwei Gruppen eingeteilt.

- Nach dem enteralen Übertragungsweg
- Nach dem parenteralen Übertragungsweg

Hepatitis A und E werden fäkal-oral übertragen, während Hepatitis B, C und D ausschließlich parenteral.

Die Hepatitiden können als akute oder chronische Virushepatitis verlaufen, infizieren hauptsächlich die Leber und bewirken eine chronische Entzündung der Hepatozyten. Das klinische Erscheinungsbild der Erstinfektion ist bei allen primären Virushepatitiden sehr ähnlich.

Nach einer Inkubationszeit, die für jedes Hepatitisvirus verschieden ist, sind im Prodromalstadium „grippenähnliche„ Beschwerden festzustellen, die mit Fieber, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Erbrechen einhergehen. 3-10 Tagen danach tritt meist akut die ikterische Phase ein. Diese Phase ist durch Dunkelfärbung des Urins, Hellerwerden des Stuhles, Ikterus mit gelblicher Verfärbung der Skleren

bzw. der Haut und diffusen Abdominalschmerzen charakterisiert. Die akute Hepatitis A und E klingen nach 4 bis 8 Wochen ab, Hepatitis B und C nach 3 bis 4 Monaten.

Einen fulminanten, meist tödlichen Verlauf ist bei etwa 1% aller akuter Hepatitiden zu beobachten und nimmt mit zunehmendem Alter der Patienten zu. Bei Hepatitis B und D Infektion ist ein fulminanter Verlauf häufiger.

Ein anikterischer und klinisch inapparenter Verlauf ist viel häufiger anzutreffen als der oben beschriebener typischer Verlauf. Etwa 50% der Hepatitis-B-Virus Infektionen und etwa 75% der Hepatitis-C-Virus Infektionen zeigen keine klinische Symptomatik. Hepatitis-A-Virus Infektion verläuft im Kindesalter bis zu 5 Jahren in fast 100% der Fälle subklinisch und im Erwachsenenalter bei etwa 30%.

Hepatitis A und E verlaufen ausschließlich akut. Chronische Fälle sind nicht bewiesen worden und es kommt fast immer zu einer Heilung, ausgenommen der fulminanten Fällen. Hepatitis B, C und D können in eine chronische Verlaufsform übergehen und dies ist der Fall, wenn das entzündliche Krankheitsbild für mehr als 6 Monaten persistiert. Eine chronische Virushepatitis kann ein unterschiedliches klinisches Krankheitsbild zeigen. Sie kann asymptomatisch verlaufen und durch eine Routineuntersuchung diagnostiziert werden, kann einen milden Verlauf mit unspezifischen Symptomen, wie Leistungsschwäche, diffuse Oberbauchschmerzen haben oder das Bild einer Krankheitssymptomatik ähnlich einer akuten Virushepatitis zeigen. Chronische Hepatitiden verlaufen in etwa 20 bis 30% progredient und gehen in eine Leberzirrhose über mit der entsprechenden Symptomatik.

Ein signifikant erhöhtes Risiko, daß eine chronische Hepatitis in ein primäres Leberkarzinom überzugehen, haben die Hepatitis B- und Hepatitis C-Träger.

1.1.2 Hepatitis A

Die Hepatitis A ist seit Jahrzehnten bekannt. Fast 1,5 Millionen Erkrankungsfälle werden pro Jahr berichtet und etwa 15000 davon führen zum Tod (CHRISTENSEN et al. 1995).

Das Hepatitis A Virus wird fäkal-oral übertragen. Das von Infizierten mit dem Stuhl ausgeschiedener Virus, wird über kontaminierte Speisen und Getränke aufgenommen. Zu den Risikogruppen zählen vor allem: Reisende in Endemiegebieten, medizinisches Personal, Kanalarbeiter und Klemmer, Personal in Kindertagsstätten, Personen in Behinderteninstitutionen für Homosexuelle

Die Inkubationszeit beträgt etwa 14 bis 40 Tagen (FROESNER et al. 1991) und die Manifestationsrate der Erkrankung ist wesentlich vom Alter abhängig (FROESNER et al. 1994). Kinder bis 5 Jahren erkranken nur in etwa 10% klinisch, Jugendliche und Erwachsene machen in mehr als 80% eine ikterische Erkrankung durch.

Die Diagnose einer Hepatitis A Infektion wird serologisch durch den Nachweis von Anti-HA und/oder den Nachweis des Erregers gestellt.

1.1.3 Hepatitis B

Das Hepatitis B Virus wurde 1965 von Blumberg entdeckt und als „Australia-Antigen“ bezeichnet (BLUMBERG et al. 1965). Von der Hepatitis B sind über 300 Millionen Menschen weltweit betroffen und somit wird sie zu den wichtigsten Krankheiten gezählt. Endemiegebiete sind Südost-Asien, Zentral- und Süd-Afrika. In diesen Gebieten sind bis zu 20% der Bevölkerung HbsAg positiv. In den Industrieländern ist dagegen weniger als 1% der Bevölkerung chronisch infiziert. Heute ist eine Hepatitis-B-Prophylaxe möglich.

Folgende von den Gene des HBV kodierte Antigene sind von diagnostischer Bedeutung: HbsAg (Hepatitis-B-surface-Antigen), HBcAg (Hepatitis-B-core-Antigen), HbeAg (Hepatitis-B-e-Antigen).

Das HBV wird parenteral durch Exposition zu infektiösem Blut und Blutprodukten, Körperflüssigkeiten wie Speichel, Samen und Vaginalsekret sowie durch ungeschützte hetero- oder homosexuelle Geschlechtsverkehr. Vor der Entdeckung des Erregers war die Hepatitis B eine Transfusionsfolge, die sehr gefürchtet war. Das ist jedoch heute durch das Screenig der Blutproben nicht mehr

der Fall. Zu den Risikogruppen zählen Personen die im medizinischen sowie zahnmedizinischen Bereich tätig sind, Dialysepatienten, Hämophilie, Drogenabhängige, Neugeborene von HbsAg positiven Müttern, Personen mit häufigem Partnerwechsel, homosexuelle Männer als auch Personen die häufig in Endemiegebieten reisen. Personen, die mit chronischen HB-Virusträgern eng zusammenleben können sich über Geräte des täglichen Gebrauchs infiziert werden, wenn diese gemeinsam benutzt werden (SHAPIRO et al. 1993, WRIGHT et al. 1999).

Die Inkubationszeit des HB Virus liegt zwischen 40 und 180 Tagen. In knapp 90% der Fälle zeigt sich ein unkomplizierter Krankheitsverlauf mit spontaner Ausheilung. Ein fulminativer Verlauf wird bei etwa 0,2 und 2% beobachtet. Das Hauptproblem bei einer Hepatitis-B-Infektion ist Chronifizierung der Infektion, die bei etwa 5% der Fälle eintritt und mit dem Alter zunimmt. Etwa 20 bis 40% der chronischen Hepatitis B-Virusträger entwickelt eine chronische Hepatitis unterschiedlicher Aktivität, die bei 10 bis 30% dieser Patienten im Verlauf der Jahren in eine Leberzirrhose übergeht. Das Risiko eine chronische Hepatitis B in ein hepatozelluläres Karzinom überzugehen, ist im Vergleich zu HbsAg negativen Personen auf das 100fache erhöht.

4 bis 6 Monaten nach akuter Erkrankung kann das Anti-HBs nachgewiesen werden. Ein Anti-HBs Befund bei gleichzeitigem Vorhandensein von Anti-HBc zeigt Immunität nach abgelaufener Hepatitis B Infektion an. Anti-HB Nachweis ohne Anti-HBc ist der typische Befund nach einer Hepatitis-B-Impfung. Anti-HBs wird zur Prüfung der Immunität gegen Hepatitis B und zur Untersuchung der Durchseuchung bei Risikogruppen herangezogen. Das Vorhandensein von HbeAg ist immer mit Produktion von infektiösen Viruspartikeln verbunden und deshalb ist die Bestimmung von HbeAg nur in HbsAg-positiven Seren sinnvoll. HbeAg korreliert mit dem Vorhandensein des Virus und jedes HbeAg-haltiges Serum ist als infektiös zu betrachten. Die Bestimmung von HbeAg dient der Prüfung der Infektiösität, der Verlaufskontrollen der akuten und chronischen Hepatitis B und der Erfolgskontrolle der antiviralen Therapie.

Der direkte Nachweis des HB-Virus wird durch den HBV-DNS-Nachweis mittels Hybridisierung oder PCR gestellt.

1.1.4 Hepatitis C

Nach Angaben der WHO sind mehr als 170 Millionen Menschen mit dem HCV chronisch infiziert, was einer globalen Prävalenz von etwa 3% (0,1 bis 12% in den verschiedenen Ländern) entspricht. Die Inzidenz symptomatischer HCV-Neuinfektionen wird auf 1 bis 3 Fälle pro 100.000 Personen jährlich geschätzt. In den Industrieländern ist Hepatitis C für etwa 20% der akuten Hepatitisfälle, 70% der chronischen Hepatitiden, 40% der fortgeschrittenen Zirrhosefälle, 60% der primären Leberzellkarzinome und 30% der benötigten Lebertransplantationen verantwortlich (NISHIOKA et al. 1990).

Vor seiner Identifizierung wurde das Hepatitis C Virus als ein parenteral übertragenes Non A, Non B Hepatitis Virus bezeichnet und war die häufigste Ursache von Posttransfusionshepatitiden (etwa 60 bis 90 % aller Fälle), sowie der Hepatitisfälle bei Empfänger von Blutprodukten und bei Dialysepatienten. Durch das Screenen aller Blutkonserven und der Eliminierung aller positiven Proben hat sich die durch Transfusion übertragbare Hepatitis C deutlich reduziert.

Risikogruppen sind insbesondere Empfänger von Blut, Blutprodukten oder Organen (Leber, Nieren oder Knochenmark), Dialysepatienten vor Einführung des HCV-Screenings und i.v. Drogenabhängige. Das sexuelle Übertragungsrisiko in monogamen Partnerschaften ist sehr gering, allerdings bei homo- und heterosexuellen Personen mit häufigem Partnerwechsel erhöht.

Die Hepatitis C Infektion hat eine Inkubationszeit von 6 bis 12 Wochen. In etwa 75% der Fälle verläuft die Infektion subklinisch oder mit einer nur schwach ausgeprägten Symptomatik. Nur bei etwa 25% der Hepatitis C Infektionen entwickelt sich das Krankheitsbild einer akuten Hepatitis. Bei 15% der Patienten mit akuter Hepatitis C Infektion kommt es zur Spontanheilung und Viruselimination. Fulminante Verlaufsformen der akuten Hepatitis C sind extrem selten (<1,1%). Weitere 25% entwickeln eine chronische, asymptomatische Verlaufsform. Die chronische Hepatitis C verläuft meist schleichend mit milder Symptomatik über viele Jahre. Bei etwa 30% der Patienten mit chronischer Hepatitis C entwickelt sich nach 20 bis 30 Jahren eine Leberzirrhose. Die Leberzirrhose stellt einen erhöhten Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms dar.

Die Diagnose einer Hepatitis C Infektion wird durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern bzw. der viralen RNS gestellt.

Für den Anti-HCV Nachweis werden festphasengebundene rekombinierte oder synthetische HCV-Proteine als „Capture-Antigene“ verwendet.

Die Therapie einer Hepatitis C ist die Interferon- α Gabe. Ziele der Therapie sind die Elimination bzw. Suppression der Virusaktivität, Verminderung der Entzündungsaktivität in der Leber und Verhinderung der HCV-Risiken wie die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom.

1.1.5 Hepatitis D

1977 wurde das Hepatitis D Virus von RIZETTO et al. in Leberbiopsien von Patienten in Süditalien entdeckt (RIZETTO et al. 1977). Nachträgliche Untersuchungen haben gezeigt, daß bereits vorher ungeklärte fulminante Hepatitiden das Hepatitis D Virus als Ursachen hatten.

Die Hepatitis D Infektion zeigt eine weltweite Verbreitung. Es wird geschätzt, daß über 15 Millionen Menschen chronisch mit dem HDV infiziert sind, was einen Anteil von etwa 5% aller HbsAg-Träger entspricht. 1977 wurde das Hepatitis D Virus von RIZETTO et al. in Leberbiopsien von Patienten in Süditalien entdeckt (RIZETTO et al. 1977). Nachträgliche Untersuchungen haben gezeigt, daß bereits vorher ungeklärte fulminante Hepatitiden durch dieses Virus verursacht waren.

Die HDV Infektion zeigt eine weltweite Verbreitung. Es wird geschätzt, daß über 15 Millionen Menschen chronisch mit dem HDV infiziert sind, was einen Anteil von etwa 5% aller HbsAg-Trägern entspricht. Man unterscheidet zwischen endemischen und nicht endemischen Regionen (westliche Industriestaaten).

Die Hepatitis D wird hauptsächlich parenteral übertragen, durch Kontakt mit kontaminierten Blut- und Blutprodukten und besonders durch den i.v. Drogenmißbrauch. Seltener als bei Hepatitis B ist die Übertragung der Hepatitis D durch den Sexualweg, durch Transfusionen von Vollblut und durch die Hämodialyse.

Hepatitis D Virus ist ein inkomplettes, replikationsdefektes Virus. Genom und Kernprotein werden von einer Hülle aus HbsAg-Hepatitis-B-Oberflächenantigen umgeben. Zur Kodierung und somit zur Replikation und Auslösung einer Infektion, benötigt das Hepatitis D Virus das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HbsAg) (DAVIES et al. 1992). Aus diesem Grund ist eine HDV-Infektion nur als Koinfektion (d.h. HDV und HBV werden zur gleichen Zeit erworben) oder als HDV-Superinfektion (d.h. HDV-Infektion eines Patienten der bereits chronisch mit dem HBV infiziert ist) nur zusammen mit einer Hepatitis B Virus Infektion möglich.

Die Inkubationszeit beträgt 20 bis 60 Tage. Als Koinfektion verläuft die HDV - Erkrankung meist wie eine typische akute HBV-Infektion, als Superinfektion eines HBV- Trägers zeigt sie oft schweren und nicht selten fulminanten Verläufen. Etwa 70 bis 95% der Superinfektionen entwickeln eine chronische Hepatitis D, die in der Mehrzahl der Fälle (etwa 70%) innerhalb von 10 bis 20 Jahren zur Leberzirrhose mit späterem Leberversagen führt. Etwa 15% erreichen diesen Zustand schon nach 1 bis 2 Jahren nach der Infizierung. Nur etwa 15% zeigen eine Remission.

Die Diagnose einer Hepatitis D Infektion wird durch den Nachweis von Anti-HDV-IgG und IgM, als auch durch die Bestimmung des HDAg oder der HDV-RNS im Serum bzw. Lebergewebe gestellt.

Anti-HDV werden zum Nachweis von akuten, chronischen und abgelaufenen Hepatitis D bestimmt.

Die HDV-RNS wird mittels RT-PCR nachgewiesen.

2. HEPATITIS E

2.1 Geschichte der Hepatitis E Forschung

Im Winter 1955-1956 folgte einer Überschwemmungskatastrophe in Delhi/Indien eine große Epidemie akuter Virushepatitis, die 29.000 Personen betraf. Damals galt diese Epidemie als eine Epidemie des Hepatitis A Virus, obwohl viele der Betroffenen eine Hepatitis A durchgemacht hatten. Eine retrospektive Studie im Jahre 1980 mit konservierten Patientenserum dieser Epidemie zeigte, daß es sich um keines der zwei bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Hepatitisviren (HA und HB) handelte, weshalb diese Krankheit als Non A-Non B (NANB) Hepatitis bezeichnet wurde (WONG et al. 1980). Es war bewiesen, daß die Epidemie in Delhi eine durch kontaminiertes Wasser übertragene Infektion gewesen ist, d.h. eine enteral übertragbare Infektion, für die aber nicht das fäkal-oral übertragene Hepatitis A Virus verantwortlich war.

Hinweise, vor allem in Indien, daß es ein neuer Erreger für eine enteral übertragene Hepatitis existiere, gab es immer wieder in der Folgezeit. Im Bereich der ehemaligen Sowjet Union wurde nach einer Epidemie in Kirgisien, wo über 10.000 Fälle akuter Hepatitis vor allem bei jüngeren Erwachsenen registriert wurden, auch über die Existenz von einer NANB-Hepatitis berichtet. Aufgefallen war, daß bei dieser Epidemie etwa 20% der infizierten Schwangeren starb.

Immer wieder wurden zahlreiche Epidemien, epidemieartige Ausbrüche, sowie sporadische Fälle von enteral übertragener Virushepatitiden aus der ganzen Welt berichtet.

1983 bewies BALAYAN durch orales Infizieren einer Person mit aufbereiteten Stuhlproben die von einem infizierten Patienten stammten, daß es sich um ein enteral übertragenes Virus handelte.

Die Erforschung der als NonA-NonB bezeichneten Hepatitis begann 1978 mit der erfolgreichen intravenösen Übertragung auf vier Schimpansen menschlichen Serums, das von Patienten stammte die an NANB Hepatitis erkrankten. Die Schimpansen sind nach dieser experimentellen Infektion alle erkrankt. Somit war ein Tiermodell

gefunden worden, das bei der Charakterisierung der Eigenschaften des HEV benutzt werden konnte (TABOR et al. 1978).

In der Folgezeit wurden weitere Tiermodelle mit Tamarine, Cynomolgus-Affen und Rhesus-Affen erprobt und entwickelt (BRANDLEY et al. 1987, GUPTA et al. 1990).

1988 wurden durch BRANDLEY et al. Virusstämme aus drei verschiedenen geographischen Bereichen der Welt (Usbekistan/Zentralasien, Mexiko/Mittelamerika, Somalia/Nordafrika) serologisch und biochemisch charakterisiert.

KRAWCZYNSKI und BRANDLEY konnten 1989 32 bis 34 nm großen Viruspartikeln mittels Immunelektronenmikroskopie nachweisen. Diese Partikel wurden mit der Hepatitis E in Zusammenhang gebracht.

REYES et al. stellten 1990 eine cDNS-Sequenz fest, die spezifisch für die enterale NANB Hepatitis war. Durch die Anwesenheit von viraler RNS in Proben von Patienten aus Mexiko, Somalia, Taschkent, Burma und Pakistan konnte die Erkrankung nachgewiesen wurde.

Das gesamte Genom dieses Virus wurde kurz darauf kloniert und sequenziert (BRANDLEY et al. 1991, HUANG et al. 1992, UCHIDA et al. 1992, REYES et al. 1993). Die Kartographierung des Virus ist 1991 gelungen (TAM et al. 1991).

Eine Expressierung viraler Proteine in Insektenzellen konnte durchgeführt werden (HE et al. 1993, TSAREV et al. 1993).

Anschließend ist die Sequenzierung von Hepatitis E Virusstämme aus Pakistan und Kirgisien gelungen. Somit wurde ein Vergleich zwischen den Virusstämmen möglich (TSAREV et al. 1993).

DAWSON et al. ist es 1992 gelungen vier Antigene vom Mexiko- und von Burma-Referenz-Stamm zu klonieren und in *E. coli* als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) zu exprimieren. Dadurch konnte ein erster Antikörper-Assay-System entwickelt werden und somit auch ein Fortschritt in der Immundiagnostik der Hepatitis E gemacht werden.

HEV verursacht in Entwicklungsländern Asiens, Afrikas, Mittel- und Südamerikas mit unzureichendem Hygienestandard regelmäßig große Epidemien, die viele Personen betreffen. Solche Epidemien sind aus vielen Ländern berichtet worden. Indien: 1955-1956 in Delhi, 1975-1976 in Ahmedabad, 1978-1979 in Kaschmir, 1987 in Andaman, 1987-1988 Süd Delhi, 1988-1989 in Saatara und Pune,

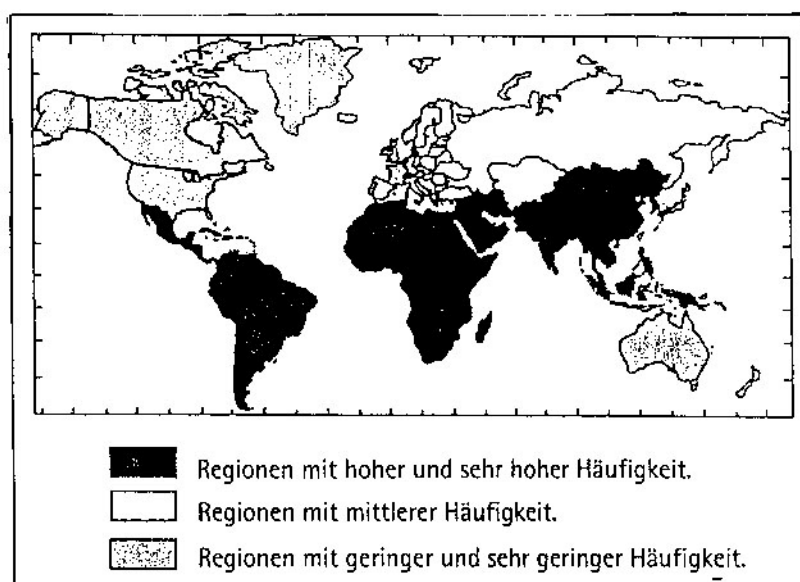
1991 in Kanpur, 1992 in Jammu, Hyderabad und Aligarh, in Nepal: 1981-1982 in Katmandu, in der ehemaligen Sowjet-Union: 1955-1956 in Kirgisien, 1986 in Urbeistan, 1990 in der Wolga- Region Rußlands, 1992 in Usbekistan, in Burma: 1976-1977, in Pakistan: 1987 in Sargotta, in China: zwischen 1982 und 1991 neun Epidemien in 6 der 30 Provinzen, davon 1986-1986 in Xinjiang, in Mexiko: 1986 in Huitzililla und 1986-1988 in Telixtac, sowie in Nord-, Ost-, und West-Afrika: Algerien 1980-1981, Äthiopien 1988-1989, Somalia und Sudan 1985 in Flüchtlingslagern, Somalia 1988-1989, Ägypten 1986.

Die größte bis jetzt berichtete Epidemie, die über 100.000 Menschen betraf, war die Epidemie in Xinjiang/China.

Zusätzlich zur epidemischen Hepatitis verursacht das HEV in den endemischen Gebieten akute sporadische Infektionen, die mehr als 25% aller akuten Hepatitiden ausmachen. So werden z.B. in Indien etwa 30% aller sporadischen Virenhepatitiden durch HEV verursacht, in Marokko machte die Hepatitis E über 60% der akuten Hepatitisfällen aus..

Abbild 2.1: Hochendemieregionen der Hepatitis E

(aus FROESNER, 1994)



Die Seroprävalenzraten von Anti-HEV in den hochendemischen Bereichen zeigen große Schwankungen bleiben jedoch immer hoch. Unabhängig von Epidemien werden hohe Anti-HEV Prävalenzraten ermittelt. So wurden Anti-HEV in etwa 50% der Bevölkerung Indonesiens (CORVIN et al. 1997), in bis zu 50% in Malaysia (SEOW et al. 1999), in 44% der Blutspender in Madras/Indien (FROESSNER et al. 1999), in 9% in Vietnam (HAU et al. 1999), in 14% in Burundi (AUBRY et al. 1997), in 10,5% unter den bis 29 Jahre alte Personen in Mexiko (ALVAREZ et al. 1999), in 60 bis 70% in Gebieten Ägyptens (FIX et al. 2000) gefunden. Erhöhte Anti-HEV Prävalenzen sind auch in Hong Kong mit 16,1% (LOK et al. 1992), in Saudi Arabien mit 14,9% unter den Saudis und 33,3% unter den Saudis im Mittleren Osten (ARIF et al. 1994, ABDELAAL et al. 1998), in Nepal mit 16 bis 31% (CLAYSON et al. 1997) und in Singapur mit 10,5% (CHOW et al. 1996) vorhanden.

In den Industrieländern tritt die HEV Erkrankung selten auf. Hier sind vor allem Personen betroffen, die in ein Hochendemiegebiet der Hepatitis E gereist sind (BADER et al. 1991, SKIDMONE et al. 1991, HARRERA et al. 1993, PURCELL et al. 1996, REYES et al. 1997, OOI et al. 1999).

In den letzten Jahren sind in den Industrieländern akute Fälle von Hepatitis E aufgetreten bei Personen, die keine Reiseanamnese in ein Hochendemiegebiet vorwiesen, aufgetreten. So wurden unter anderem, Fälle von akuter sporadischer Hepatitis E Infektionen in den USA (KWO et al. 1997, THOMAS et al. 1997, ERKER et al. 1999, SCHLAUDER et al. 1998), in Italien (ZANETTI et al. 1994), in Griechenland (SCHLAUDER et al. 1999), in Schweden (JOHANSON et al. 1995), in Österreich (WORM et al. 1998), in Großbritannien (Mc GRUDDEN et al. 2000), in Spanien (JARDI et al. 1998, PINA et al. 2000)), in Japan (TAHASKI et al. 2002), in Frankreich (BOHME et al. 1998), in Norwegen (SKAUG et al. 1994), in Süd-Afrika (TUCKER et al. 1996), in Kuwait (KOSHY et al. 1994), in Argentinien (SCHLAUDER et al. 2000) und in Neu Seeland (CHAPMAN et al. 1993) berichtet.

Bei Seroprävalenzuntersuchungen unter der gesunden Bevölkerung in den Industrieländern sind Anti-HEV-Raten ermittelt worden, die von 1% bis sogar 22% reichen. In Ländern Europas sind Anti-HEV Prävalenzraten in Deutschland von 2 bis 5,1% (KNODLER et al. 1994., FROESSNER et al. 1999, NUBLING et al. 2002), in Spanien in etwa 2,9% (MATEOS et al. 1998, TARRAGO et al. 2000), in

Griechenland 2,2% (PSYCHOGIOU et al. 1996), in Portugal 2,5 bis 4% (QUEIROS et al. 1997, MACEDO et al. 1998), in Italien 0,7 bis 1,7% (ZANETTI et al. 1994, PAVIA et al. 1998), in London-City 3,9% (BERNAL et al. 1996), in der Niederlande 1,8% (ZAAIJER et al. 1995), in Frankreich 1,2% (RITTER et al. 1993) und in Moldawien von 24,7% (DROBENIUC et al. 2001) ermittelt worden.

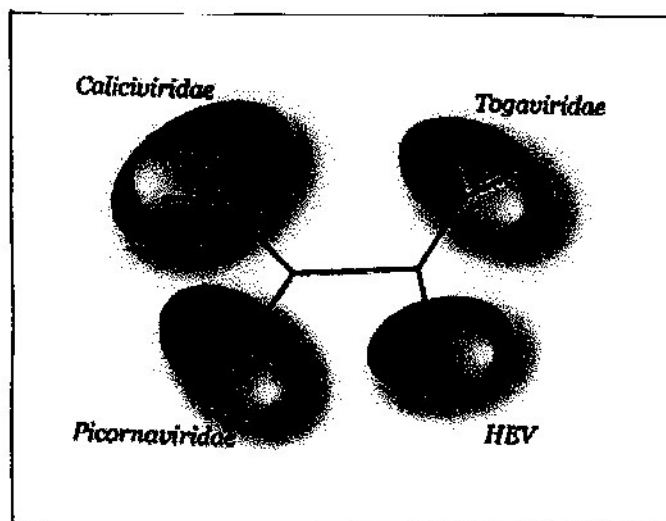
Auch ist ein Vorhandensein von Anti-HEV bei 1 bis 21% der gesunden Bevölkerung in den USA festgestellt worden (THOMAS et al. 1997, KARENTYI et al. 1999, MAST et al. 1997, MENG et al. 2002), bei 2,4% in Kanada (YOO et al. 2000), bei 2 bis 3% in Brasilien (PARAMA et al. 1997, GONSALES et al. 2000), bei 8% in Chile (IBARRA et al. 1997), bei 6,6% in Argentinien (FAINBOIN et al. 1999), bei 4,4 bis 19,4% in Bolivien (BARTOLINI et al. 1999), bei 2,8% in Uruguay (CRUELLS et al. 1997) und bei 3% in Grönland (LANGER et al. 1997).

Des weiteren sind Anti-HEV in 0,4% der Bevölkerung in Australien gefunden worden (MOAREN et al. 1995), bei 6,6 bis 15,3% in Süd Afrika (TUCKER et al. 1996), bei 11% in Taiwan (LIN et al. 2000), bei 4% in Libanon (IRANI HAKIME et al. 1998), bei 2,8% unter den Israelis und bei 1,8% unter den Araber in Israel (KARENTNYI et al. 1995).

Die Ursache für die große Diskrepanz zwischen der relativ hohen Anti-HEV-Prävalenzrate und der geringen Zahl der Hepatitis E Erkrankungen in Nichtendemiegebieten ist noch offen.

Das HEV wurde zuerst aufgrund seiner morphologischen und biochemischen Ähnlichkeiten mit dem Norwalkviren in die Familie der Calciviridae eingestuft (MILLER et al. 1995). Jedoch die neuesten Untersuchungen haben gezeigt, daß die Genomorganisation des HEV und des Norwalkvirus Unterschiede zeigt. Nach den neuen Empfehlungen des Internationalen Ausschusses für die Taxienomie der Viren (ICTV) wird das HEV in eine eigene Familie innerhalb der Kategorie der RNS-positiven Viren plaziert, die der HEV-like-Viren (BERKE et al. 2000). Analysen der RNS-Helikase (Hel) und der RNS-abhängigen Regionen der RNS-Polymerase von HEV und anderen RNS-Positiven Viren zeigen, daß HEV eine eigene phylogenetische Gruppe bildet, die dem Rötelnvirus (Familie der Togaviridae) näher steht als der Familie der Calciviridae. Eine endgültige Klassifizierung des HEV bleibt noch offen und hängt vom weiteren Wissen über den Reproduktionsmechanismus und die Eigenschaften seiner Teilproteinen ab.

Abbildung 2.2.1.2: Klassifizierung des HEV
(nach BERKE et al., 2000)



Das Virus scheint sehr instabil zu sein und widersteht hohen Konzentrationen von Salzen einschließlich Caesiumchlorid nicht. Das Virus wird auch häufig beim Versuch dieses aus einer Stuhl-Suspension durch Gradiententrennung zu reinigen oder pelletieren zerstört.

Fraktionieren von 32 bis 34 nm VLPs (virus like partikel) in Saccharose-Dichte-Gradienten lieferten partiell gereinigte Viren. Der errechnete Sedimentations-Koeffizient betrug annähernd 183 S. Das HEV ist empfindlich gegenüber Einfrieren/Auftauen, Lagerung in flüssigen Suspensionen bei Temperaturen zwischen $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie Pelletieren aus Saccharose oder Pufferlösungen.

2.2.2 Das HEV-Genom

Nach der Entdeckung des HEV das Ziel vieler Untersuchungen war die Klonierung des Virus-Genoms. Aufgrund der enteralen Aufnahme und der fäkalen Ausscheidung des HEV wurde versucht das Virus-Genom aus Stuhlproben infizierter Patienten zu klonieren. Es konnte jedoch dadurch kein virusspezifischer Klon erhalten werden, da die Viruspartikeln in den Stuhlproben sich in einem degradierenden Zustand befanden. Es wurde daraus gefolgert, daß der Virus während seines Transportes durch den Darm schädlichen Einflüssen unterworfen ist, die seine Intaktheit zerstören (Centers of Disease Control 1987). Die folgenden Versuche basierten auf der Tatsache, daß die Virusproduktion bei einer HEV Infektion hauptsächlich in der Leber stattfindet, und daß das Virus mit der Galle in die Gallenblase gelangt und dort in hohen Konzentration zu finden sein müßte. So wurden Cynomolgus-Affen mit HEV infiziert. Während der akuten Phase der Erkrankung wurde Galle aus der Gallenblase abgesaugt, die tatsächlich eine hohe Konzentration von intakten Viruspartikeln erhielt (PURCELL et al. 1988).

1991 gelang TAM und seiner Arbeitsgruppe das HEV zu klonieren und komplett zu sequenzieren.

Das HEV-Genom besteht aus einem RNS-Einzelstrang von positiver Polarität und ist etwa 7,5 Kilobasen lang. Es besitzt drei offene Leserahmen ORF1, ORF2 und ORF3 (ORF: open reading frames). Alle drei ORFs werden während der

Virusinfektion exprimiert. (REYES et al. 1990, YARBOUGH et al. 1991, BRANDLEY et al. 1992, UCHIDA et al. 1992).

Die Viren-RNS enthält auch kurze 5' und 3' nichtübersetzte Regionen (UTR-s) von 26 bzw. 68 Nukleotiden (PANDA et al. 1995). Diese haben das Potential sich in konservierte Stamm-Schleifen und Haarnadelstrukturen zu falten. Am 5'-Ende des Genoms befinden sich die nichtstrukturelle Gene, die durch den offenen Leserahmen 1 (ORF1) kodiert werden.

ORF1 besteht beim Burma-Referenzstamm aus 5079 Nukleotiden und ist für die Kodierung der RNS-abhängigen RNS-Polymerase, der Helikase, der Virenmethyltransferase und der Proteasen zuständig. Das Vorhandensein einer Schutzkappe am 5'-Ende des HEV-RNS-Genoms bestätigt eine Funktionsrolle der Methyltransferase (KABRANE-LAZIZI et al. 1999).

Die Strukturproteine des Virus, ORF2 und ORF3, sind am 3'-Ende lokalisiert.

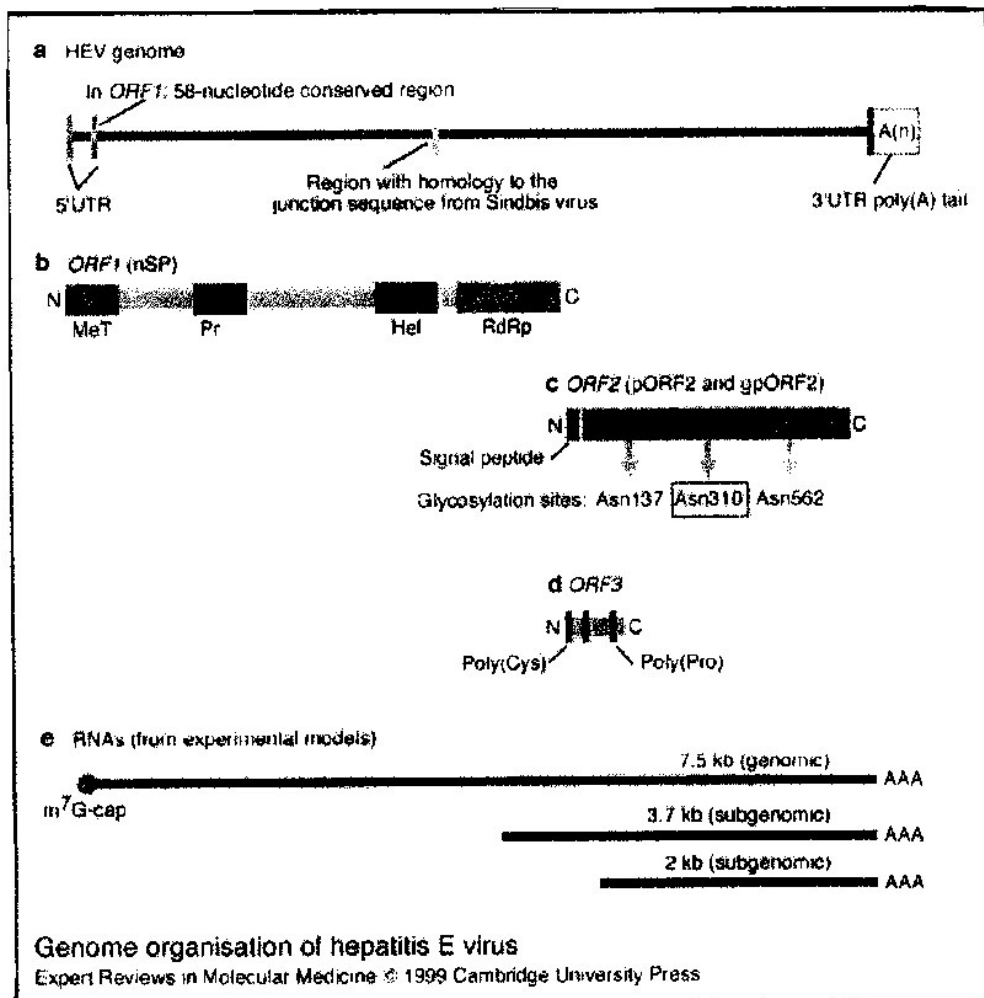
ORF2 hat eine Länge von 1980 Nukleotiden und kodiert das Viruskapsidprotein (pORF2), das eine Länge von 660 Aminosäuren hat (BRANDLEY et al. 1993, PURDY et al. 1994). In den Wirtszellen ist es als eine etwa 74 kDa Protein (pORF2) und glykosiliert als eine etwa 88 kDa Protein (gpORF2) vorhanden. Es wurde experimentell gezeigt, daß ORF2 eine N-terminal Signalreihenfolge trägt. Das pORF2 wird im endoplasmatischen Retikulum durch Addition von N-gebundenen Mannosezuckerresten zu gpORF2 glykosiliert. Es gibt drei Orte der Glykolisierung auf dem pORF2: Asparagin in den Aminosäurenpositionen 137, 310 und 562. Während diese drei Orte glykosiliert sind, scheint Asn 310 der Hauptort der N-glykan Addition zu sein. Das ORF2 kodierte Protein kann auch auf der Zelloberfläche gesehen werden (ZAFRULLAH et al. 1999). Vor kurzem ist vermutet worden, daß das gpORF2 eine instabile Form des Proteins darstellt (TORRESI et al. 1999). Das ORF2 kodierte Protein wurde mit verschiedenen Expressionssysteme charakterisiert: in *E. coli*, in Insektenzellen mit bakuloviralen Vektoren und in Tierzellen in Form von Plasmiden, rekombinanten Vaccinia Viren und Alpha-Viren.

Der ORF3 fängt mit dem letzten Nukleotid von ORF1 an, besteht aus 369 Nukleotiden und überlappt teilweise ORF2. Er kodiert ein Phosphorprotein (p ORF3), ein kleines Protein das aus 123 Aminosäuren besteht. Die Funktion des Proteins ist derzeit noch nicht sicher erklärt. Es scheint in Verbindung mit dem Zytoskeleton zu stehen und es wird ihm eine Funktion als Adapterprotein zugeschrieben. Es könnte

möglich sein, daß es bei der Reproduktion des HEV -RNS oder dem Zusammenbau der produzierten HEV-Partikeln eine Rolle spielt (ZAFRULLAH et al. 1997).

Abbild 2.2.2: Genom-Organisation des Hepatitis E Virus

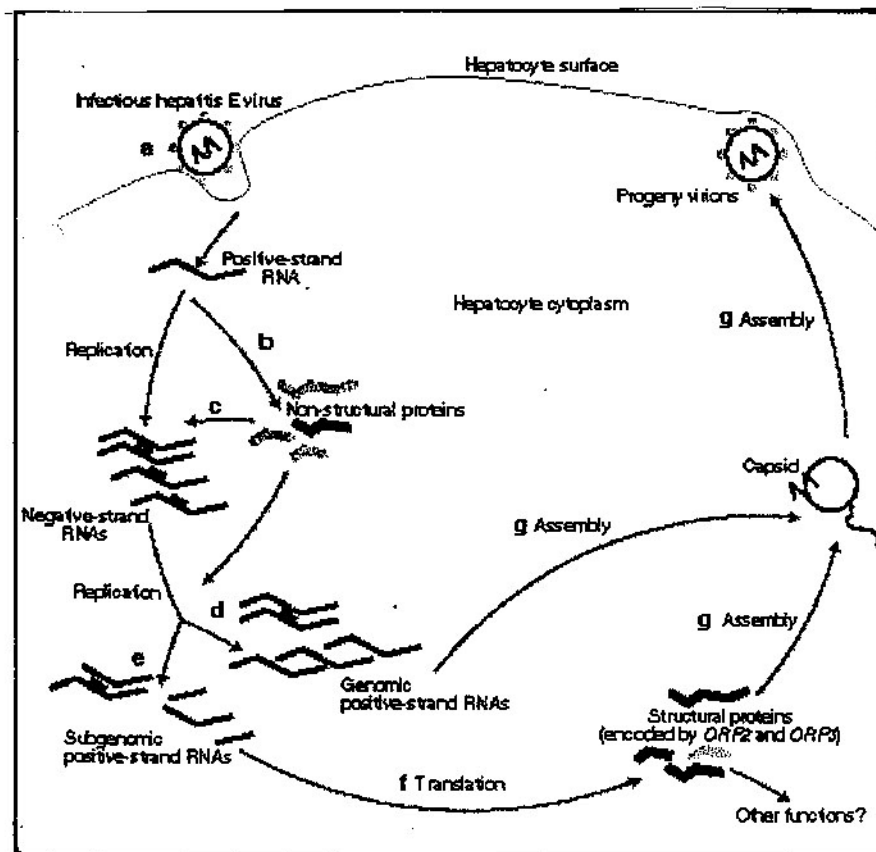
(nach JAMEEL, 1999)



2.2.3 HEV- Replikation

Für die Replikation und Genexpression des HEV ist ein Modell vorgeschlagen worden, das auf der Ähnlichkeit und Homologie des HEV mit anderen vollständig charakterisierten positiv-RNS-Viren basiert. Das Modell wurde von JAMEEL et al. vorgeschlagen und basiert auf Arbeiten von YARBOURG, REYES, TAM, NANDA, und KABRANE-LAZIZI.

Abbild 2.2.3: Ein vorgeschlagenes Modell für die Replikation des Hepatitis E Virus (nach Jameel, 1999)



Nach dem Eintritt des Virus in die Hepatozyte, wird das positive-RNS-Virengenom im Zytosol der angesteckten Zelle exprimiert um das vom nichtstrukturellen ORF1 verschlüsseltes Polyprotein (usP) zu produzieren. Da dieses die Virusreplikase enthält, wird sie zur Replikation des RNS-negativen-Strangs vom RNS-positiven-Strang benötigt. Dieser RNS-negative-Strang dient als Schablone für die Synthese des RNS-positiven-Strangs. Wegen der Homologie des HEV zu den Alphaviren existieren vermutlich zwei Verzweigungswege für die Synthese von RNS-positiven-Stränge zur Virus-Reproduktion. So werden zwei Kategorien von Strängen gebildet, eine Plus-Strang-RNS, die das gesamte Genom enthält, und Plus-Strang-RNS-Stücke, die Teile des Genoms enthalten. Die subgenomischen positiven RNS-Stränge werden in das strukturelle Virenprotein pORF2 übersetzt, das durch das ORF2 kodiert wird.

Die strukturelle Proteineinheit bildet ein Kapsid, das den genomischen RNS-positiven-Strang einschließt. Dadurch entstehen Nachkommenvirien die weiter Zellen anstecken können.

Dieses Modell basiert auf folgenden Beobachtungen. Das Vorhandensein von einem genomischen (~7,5 KB) und zwei subgenomischen HEV-RNS (~3,7 KB und ~2 KB) wurde in experimentell angesteckten Cynomolgus Makaken gezeigt (TAM et al. 1996). HEV positive und negative RNS-Stränge sind in der Leber vom experimentell angesteckten Rhesusaffen gefunden worden, dagegen im Serum und der Galle nur positiv RNS-Stränge (NANDA et al. 1994). Dieses spricht dafür, daß die Verdoppelungen der genomischen RNS über einen negativen RNS-Stränge stattfindet.

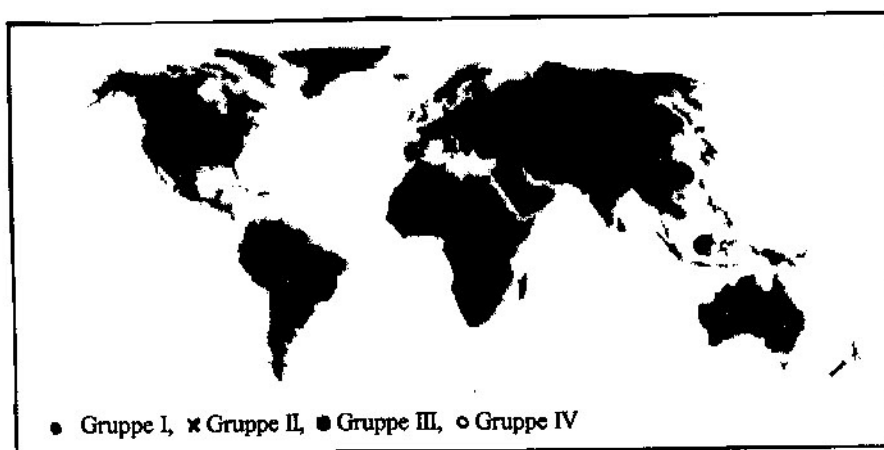
2.2.4 HEV-Gruppen und Isolate

Bis heute ist weltweit ein einziger Serotyp von HEV bekannt. Aufgrund von Vergleichen in der Gensequenz innerhalb der strukturellen und nichtstrukturellen ORFs sind die HEV Isolate bis heute in 4 Gruppen unterteilt worden, die eine Abweichung in der Nukleotidsequenz von etwa 25% von einander vorweisen. Die Gruppe 1 umfaßt alle Asien-Isolate: Referenzstamm Burma (TAM et al. 1991),

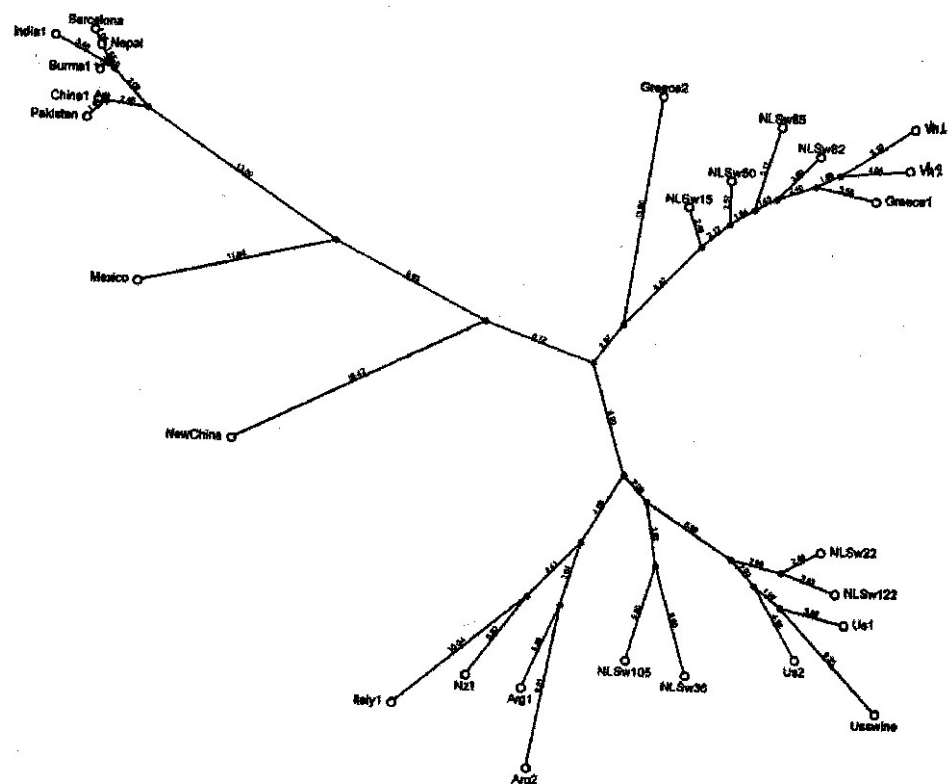
Isolate aus Indien (v. BRUNN et al. 1995), Pakistan (TSAREV et al. 1992) und China (AYE et al. 1992). Der 2. Gruppe gehört bis heute allein das Mexiko Isolat an (HUANG et al. 1992). In die 3. Gruppe gehören die in den USA im Menschen gefundene Isolate US1 und US2 (SCHLAUDER et al. 1998), Isolate vom Schwein SwUS (MENG et al. 1997), Isolate aus Europa wie die griechischen Isolate Gr1 und Gr2 (SCHLAUDER et al. 1999), das italienische Isolat It (ZANETTI et al. 1999), das österreichische Isolat Au (WORM et al. 2000), das Spanien Isolat (PINA et al. 2000) sowie die in der Niederlande entdeckte Menschen- und Schwein-Isolate (v. der POEL et al. 2001). Die 4. Gruppe umfaßt das CT1 Isolat aus China (WANG et al. 2000). Es sei hier zu erwähnen, daß von SCHLAUDER vorgeschlagen wurde die HEV Isolate in mindestens neun unterschiedlichen Gruppen unterzuteilen (SCHLAUDER et al. 2001).

Bemerkenswert ist, daß Teilsequenzen von Isolaten aus Griechenland, Italien und Österreich eine Homologie im ORF1 von 82 - 88% mit den Isolaten US1 und US2 aufweisen. Dagegen zeigen diese Isolate aus Europa eine Homologie von nur 74 - 79% mit Isolaten aus anderen Gruppen. Durch diese Homologierelation lassen sich die Isolate aus den Industrieländern deutlich von den Isolaten aus Gebieten die als hochendemisch für HEV gelten, unterscheiden und es könnte möglich sein, daß die HEV Isolate in den westlichen Industrieländern einen gemeinsamen Ursprung haben.. So ist es möglich aufgrund der Nukleinsäuresequenz auf den geographischen Ursprung des HEV-Isolats zu schließen.

Abbild. 2.2.5 : Auftreten der Gruppen der HEV-Isolaten weltweit



Abbild 2.2.4: Phylogenetische Verwandtschaft der HEV-Isolaten von Mensch und Schwein basiert auf der Sequenz eines 304 Nukleotide langen Stücks des ORF2 (nach van der POEL, 2001)



2.2.5 Krankheitsbild und Übertragung

Das HEV wird hauptsächlich durch den fäkal-oralen Weg übertragen (NAIK et al. 1992, PANDA et al. 1997). Versuche mit oraler Inokulation von aufbereiteten Stuhlproben infizierter Patienten erbrachten den Nachweis des enteralen Übertragungswegs. Die Hauptquelle der Infektion ist das durch Fäkalien verschmutzte Trinkwasser. Epidemien treten häufig in Flüchtlingslagern auf, wo Trinkwasserverschmutzungen mit Fäkalien häufig sind.

Obwohl andere Übertragungswege selten sind, sollten sie aber trotzdem in Erwägung gezogen werden. Eine vertikale in utero Übertragung des HEV kann nach einer Erkrankung der Schwangeren erfolgen (KHUROO et al. 1995). Auch die Möglichkeit einer parenteralen Übertragung ist in Betracht gezogen worden (CHAUHAN et al. 1993). Bei einigen Studien wurde eine erhöhte Prävalenzrate von Anti-HEV unter den Dialysepatienten im Vergleich mit der normalen Bevölkerung festgestellt. Berücksichtigt man, daß Dialysepatienten fast keine Reiseanamnese in ein hochendemisches Gebiet aufweisen, könnte eine parenterale Übertragung im Krankenhaus stattgefunden haben, da bei allen Viren mit einer virämischen Phase die Möglichkeit besteht durch Blut übertragen zu werden. Eine Person-zu-Person Kontaktübertragung scheint sehr selten zu sein und Personen die im gleichen Haushalt mit HEV-Erkrankten leben sollen keine erhöhte Infektionsgefahr haben. Dieses könnte in der relativ geringe Virusausscheidung im Stuhl, der schnellen Zerstörung der Infektiosität des Virus in der Umwelt oder der Notwendigkeit hoher Virusdosen für die Infektion des Menschen mit einem möglicherweise aus dem Tierreich stammenden Virus begründet sein. Auch eine nosokomiale Übertragung ist auch berichtet worden (KHUROO et al. 1992).

In Entwicklungsländern, die hochendemic für die HEV-Infektionen sind, erkranken meist junge Erwachsene aller Bevölkerungsschichten. Anti-HEV ist nur in etwa 5% der Kindern unter 10 Jahren und in 10 bis 40% der Erwachsenen älter als 25 Jahre gefunden worden (ARANKALLE et al. 1995). Zum Vergleich ist die Prävalenz des Anti-HAV unter den Kindern <10 Jahre in der Mehrzahl der Entwicklungsländern >90%. Diese mit dem Alter langsam zunehmende Seroprävalenz könnte für sporadische Übertragungen des Virus sprechen. Was die niedrige Seroprävalenz im Kindesalter betrifft, so scheint diese dadurch bedingt zu sein, daß die HEV-Infektion schwerer übertragbar ist als die HAV-Infektion.

Eine Frage die sich bei der Betrachtung der HEV-Epidemiologie stellt ist das Verbleiben des HEV während der Zwischen-Epidemie-Perioden in der Bevölkerung. Die sporadischen HEV Infektionen, die über 25% aller akuten Hepatitiden in den Entwicklungsländern ausmachen, könnten das HEV während der Zwischen-Epidemie Perioden gewährleisten. Sporadische Infektionen treten auch zwischen den Epidemien auf, und eine langanhaltende Virämie ist in etwa 10% der Fälle mit akuter Krankheit beobachtet worden (NANDA et al. 1995). Zusätzlich kommt es zu subklinischen Infektionen, was ebenfalls zur Erhaltung des Pools von HEV in der Bevölkerung beitragen könnte. HEV ist sowohl im unbehandelten als auch im gereinigten Abwasser nachgewiesen worden. Die Möglichkeit von nichthumanen Reservoirs von HEV ist vorgeschlagen worden. Anti-HEV wird in mehreren Tierarten gefunden. Es wurde gezeigt, daß zwischen HEV-Isolaten vom Schwein und Menschen in der gleichen geographischen Region große Nukleinsäurenidentität besteht, und daß HEV vom Schwein nichthumane Primaten anstecken kann. Somit ist es möglich, daß Haustiere Träger von HEV sind.

Eine Hepatitis E während einer Schwangerschaft verläuft klinisch meist schwer und zeigt eine hohe Letalitätsrate die bis zu 20% erreichen kann (KHUROO et al. 1981). Um diese hohe Sterblichkeitsrate während der Schwangerschaft zu erklären, wurde folgende Hypothese vorgeschlagen (PURCELL et al. 1997). Durch die Infektion mit dem Hepatitis E Virus werden die Kupfer-Zellen der Leber beschädigt. Dadurch kommt es zur einer Verminderung der Fähigkeit dieser Zellen einen Schutz gegen die Endotoxine der Gram-negativen Darm-Bakterien zu gewährleisten. Die Hepatozyten werden zerstört und Prostaglandine werden freigesetzt. Es kommt zu Ödembildung und Cholestase. So könnte diese Hypothese die hohe Letalitätsrate der Schwangeren erklären, wenn die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den Endotoxin-Effekt während der Schwangerschaft in Betracht gezogen wird.

Experimentelle Studien mit Übertragung des Virus auf Rhesus-Affen und Cynomolgus-Affen haben gezeigt, daß die Erkrankung bei diesen Tieren in zwei Phasen verläuft. In der Initialphase findet die Replikation des HEV in der Leber statt, wodurch die Entzündung der Leber gestartet wird. In der späteren Phase, die etwa in der fünften Erkrankungswoche beginnt, kommt es zur Progression der Hepatitis (TSAREV et al. 1993).

Ansteckende Viruspartikel sind in der Galle und im Stuhl während der späten Inkubationsphase der Hepatitis E vorhanden und können für eine oder zwei Wochen

nach Erkrankungsbeginn nachweisbar bleiben (BRANDLEY et al, 1990, UCHIDA et al., 1990). Das Virus ist auch vorübergehend im Blutstrom in der späten Inkubationsphase anwesend (CHAUHAN et al., 1993).

Anti-HEV der IgG und IgM Klassen erscheinen während der Krankheit. Anti-HEV-IgM sind in der akuten Phase nachweisbar (BRYAN et al. 1994) und bleiben meist nicht länger als 3 Monaten vorhanden (GOLDSMITH et al., 1992), während Anti-HEV-IgG später erscheint und in der Regel länger persistiert. Anti-HEV-IgG kann in manchen Fällen nur kurzfristig nachweisbar sein (LI et al. 1994, GOLDSMITH et al. 1992) und bereits wenige Wochen nach der Erkrankung nicht mehr vorhanden sein (WORM, WURZER, FROESNER, 1998). Es wurde aber auch bis zu 13 Jahre nach Infektion gezeigt.

Während einer akuten Hepatitis E Erkrankung kommt es zu einem Anstieg des Serumbilirubins und der alkalischen Phosphatase. Typischerweise wird ein Gipfelpunkt der Transaminasenwerte etwa 1 bis 2 Wochen nach Erkrankungsbeginn erreicht, gefolgt von einer völligen Normalisierung innerhalb von 4 bis 6 Wochen.

In Studien mit Primaten konnte das HEV-Antigen im Zytoplasma der Hepatozyten 10 Tagen nach i.v. Infektion und für etwa 3 Wochen gezeigt werden.

Patienten mit Hepatitis E Erkrankung weisen häufig auch andere fäkal-oral übertragene Krankheiten auf, wie Typhus oder Ruhr.

Personen, die in Industrieländern leben, haben nach einer Reise in ein Hochendemiegebiet ein erhöhtes Krankheitsrisiko.

Eine HEV-Infektion verursacht eine enteral übertragene Hepatitis die eine Inkubationszeit von 10 bis maximal 65 Tagen (mit einem Durchschnitt von etwa 30 Tagen) hat. Die klinische Symptomatik der Hepatitis E Erkrankung ist der der Hepatitis A ähnlich. Es zeigen sich ikterische oder anikterische Krankheitsbilder mit Anorexie, Nausea, Erbrechen, Fieber, Myalgien, epigastrische Schmerzen und Hepatomegalie (CHANDA et al., 1991). Andere weniger häufig auftretende Symptome sind Diarrhöe, Arthralgien, Pruritus und urtikariaähnliche Dermatitiden. Komplikationen wie neurologische, hämatologische, dermatologische, kardiopulmonale, renale oder gastrointerstinale, die bei anderen Hepatitiden auftreten scheinen bei der Hepatitis E nicht aufzutreten (Mc INTYRE et al., 1990). Im Kindesalter verläuft die HEV-Infektion häufig subklinisch.

Die Hepatitis E des Erwachsenen ist meist eine schwere Erkrankung, da sie bei etwa 3% einen fulminanten Verlauf zeigt der zum Tode führt. Die Hepatitis E geht nicht zur Chronizität über. Etwa 1 bis 2 Wochen nach Erkrankungsbeginn kommt es zu einem Gipfelpunkt und innerhalb von 4 bis 6 Wochen wird eine völlige Normalisierung der Transaminasewerte festgestellt.

2.2.6 Vorbeugung und Impfung

Bis heute steht kein Impfstoff für HEV zur Verfügung. Passive Immunisierung mit Immunglobuline die vom Plasma von Hepatitis-E-Erkrankten in hochendemischen Gebieten, gewonnen war, war wirkungslos.

Studien in Indien, zeigten, daß Patienten die Immunglobuline erhielten, keinen statisch signifikanten Unterschied bezüglich der Krankheitskinetik im Vergleich zu Patienten, die keine Immunglobuline erhielten, aufwiesen.

Eine passive Immunisierung eines Cynomolgus Makaken mit Plasma eines Tieres das vorher mit HEV infiziert wurde, bewirkte zwar eine Abschwächung des klinischen Bildes, konnte aber die Infektion nicht verhindern (TSAREV et al., 1994, PURDY et al., 1993).

Das Fehlen einer Möglichkeit das HEV in ein Gewebekultursystem zu züchten macht die Entwicklung von Impfstoffen aus gentechnisch hergestellten HEV-Peptiden notwendig. Diese Peptide sollen die Fähigkeit besitzen eine schützende Immunantwort hervorzurufen. Rekombinierte DNS-Technologie wird verwendet, um große Mengen von Peptiden herzustellen. Für das HEV scheint das ORF2 Protein als Impfstoff geeignet zu sein, wenn es in den Insektenzellen mit rekombinierten Baculoviren exprimiert wird. Solche Impfstoffe wurden gleichzeitig in zwei Instituten in den USA entwickelt und in Versuchstieren erprobt. Dieser Impfstoff ist auch einem Freiwilligen in den USA verabreicht worden und er erschien sicher und immunisierend zu sein (ROBINSON et al., 1998, FRICKER et al., 1996). Eine Erprobung des Impfstoffs läuft auf breiter Basis zur Zeit in Nepal.

Bis ein wirksamer Impfstoff verfügbar wird, beruht die Verhinderung einer HEV-Infektion auf Vorbeugungsmaßnahmen. Der Schwerpunkt dieser Vorbeugung liegt in der Sauberkeit des Trinkwassers. Epidemiologische Daten legen das Abkochen von Trinkwasser nahe, da es dadurch zu einer Inaktivierung des HEV kommt. Reisende in hochendemische Gebiete sollten Trinkwasser, Getränke und Eis unbekannter Sauberkeit, sowie ungekochte Schalentiere und Gemüse vermeiden.

3. DIAGNOSE

Die ersten Tests für den Nachweis von HEV umfaßten Immunelektronenmikroskopie um das HEV Antigen auf der Oberfläche der HEV Partikel in Stuhlproben zu ermitteln und Immunhistochemie um das HEV Antigen im Lebergewebe zu kennzeichnen (BALAYAN et al. 1983, KANE et al. 1984, BRANDLEY et al. 1988, REYES et al. 1990, TSAREV et al. 1992, YIN et al. 1994). Danach wurde ein „fluoreszenz antibody blocking assay“ entwickelt um das Anti-HEV, das mit dem HEV-Ag reagiert, im Serum zu kennzeichnen (KRAWCZYNSKI und BRANDLEY 1989, PURDY et al. 1994).

Diese Methoden waren in hohem Grade spezifisch, hatten aber eine begrenzte Empfindlichkeit. Sie haben Anti-HEV in nur 50 bis 70% der Patienten mit akuter Hepatitis E Erkrankung ermitteln können und waren nicht imstande Anti-HEV-Titer einigen Monaten nach akuter Hepatitis E Infektion nachzuweisen.

Nachdem das HEV geklont und sequentiell geordnet wurde, wurden Western Blot und Enzymimmunoassays entwickelt um das Anti-HEV nachzuweisen. Für diese Methoden wurden rekombinante Proteine oder synthetische Peptide verwendet, die immundominanten Epitopen der strukturellen Regionen des HEV (ORF2 und ORF3) darstellten (FAVOROV et al. 1992, DAWSON et al. 1992, TSAREV et al. 1993, PAUL et al. 1994, FAVOROV et al. 1994, FAVOROV et al. 1996).

In den meisten dieser Methoden waren Antigene von HEV Isolaten von mindestens zwei geographisch unterschiedlichen Gebieten verwendet worden, z.B. geklonte Isolate von Erkrankten in Epidemien in Burma und Mexiko. Die rekombinierte Proteine die für diese Tests benutzt worden sind, wurden in Ausdruck-Systeme wie E. coli und rekombinanten Baculoviren angesteckten Insektenzellen produziert.

Zusätzlich zu den Anti-HEV-IgG Nachweismethoden, sind auch Anti-HEV-IgM Tests entwickelt worden, die eine Unterscheidung zwischen akuter und abgelaufener Infektion ermöglichten (DAWSON et al. 1992, FAVOROV et al. 1992). Diese Tests konnten jedoch nicht gut standardisiert werden.

Für den Anti-HEV Nachweis sind auch Neutralisations-Tests entwickelt worden, die synthetische Peptide verwendeten.

Für den Nachweis von HEV-RNS im Stuhlproben, in der Leber und im Serum wurden PCR-Methoden entwickelt (Mc CAUSTL et al. 1991).

3.1 Nachweismethoden für die Diagnose der Hepatitis E

Für die Diagnose einer akuten oder abgelaufener Hepatitis E werden ELISA-Teste zum Nachweis von Anti-HEV-IgM- und IgG, PCR zum Nachweis von HEV-RNS und Western Blot zur Bestätigung von Anti-HEV-positiven Befunden benützt.

3.1.1 ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay)

Testverfahren, das Antigene oder Antikörper mittels eines Enzym-markierten Antikörpers (Konjugat) oder Antigens und einer dadurch katalysierte Farbreaktion semi-quantitativ nachweist.

Da bestimmte Kunststoffe Proteine gut anlagern, können sie mit einem Antigen oder Antikörper beschichtet werden. Beim Auswaschen der Kunststoffvertiefungen der ELISA Platte werden sie nicht abgelöst. Danach zugesetzte Antigene oder Antikörper binden sich an bereits gebundenen Antikörper bzw. Antigene und werden damit ebenfalls nicht mehr abgelöst, so daß sich eine Kaskade aus Antigen, Antikörpern und dem Konjugat bilden kann. Hierauf wird eine Substrat/Chromogen-Lösung zugesetzt, die nach einer bestimmten Zeit eine der Konjugatkonzentration äquivalente Färbung hervorruft. Diese wird dann mittels Photometer abgelesen und die Probe nach einer Standardkurve beurteilt.

Beim Antikörpernachweis kann der Test spezifisch für eine bestimmte Immunglobulinklasse durchgeführt werden.

Der ELISA stellt heute wohl die am besten technisierte/automatisierte Untersuchungsmethode dar. Wegen der universellen Anpaßbarkeit und der Standardisierung der ELISA-Platten ist er die am häufigsten durchgeführte Prozedur.

ELISA Testverfahren werden als indirekter Ab-ELISA, kompetitiver ELISA und Sandwich-ELISA durchgeführt.

3.1.2 PCR

Der Nachweis geringster Mengen Virusgenoms aus verschiedenstem Probenmaterial ist durch die Polymerase Chain Reaction (PCR) möglich geworden (SAIKI et al., 1988).

Dazu werden normalerweise 2 Oligonukleotide, die genomspezifisch sind, einem Nukleinsäureextrakt der vorgereinigten Probenlösung im Überschuß zugesetzt. Beim Erhitzen auf ca. 95⁰ C trennen sich die DNS Doppelstränge, beim Abkühlen auf ca. 50-60⁰ C binden sich an jeden der beiden Stränge das entsprechende Oligonukleotid. Eine hitzestabile Polymerase beginnt nach Temperaturerhöhung auf etwa 65⁰ C nun mit der Synthese neuer DNS-Doppelstränge wobei das Oligonukleotid als Primer wirkt (3'-OH-Ende). Damit ist die doppelte Menge an Doppelstrang-DNS entstanden. Durch Erhitzen werden diese Doppelstränge wieder getrennt und der Zyklus beginnt von vorn. Nach 30 bis 40 Zyklen wird genug DNS gebildet, so daß sie elektrophoretisch im Gel aufgetrennt als spezifische Bande eines bestimmten Molekulargewichts nachgewiesen werden kann.

Um sehr geringe Virusmengen nachweisen zu können, wird häufig nach einer PCR eine zweite PCR angeschlossen („nested-PCR“), bei der mit einem zweiten Paar von Primern eine zusätzliche Amplifikation erreicht werden kann. Dieses zweite Primerpaar liegt innerhalb des amplifizierten Segments. Durch die „nested-PCR“ wird nicht nur die Sensitivität des Tests, sondern auch die Spezifität erhöht.

3.1.3 Western Blot

Beim Western Blot werden in der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) aufgetrennte Proteingemische aus der Gelmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrocellulosemembran) transferiert. Durch Bindung der Proteine an die Membran bleibt dort das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Außerdem wird bei diesem Vorgang das an die Proteine angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine können renaturieren und dabei teilweise ihre Sekundär-

und Tertiärstruktur wieder einnehmen. Sie können somit von Antikörpern erkannt werden.

Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkung an die Membran gebunden. Da diese Wechselwirkung zwischen Protein und Membran nicht sehr stabil ist, müssen die Bedingungen dieser Elektrophorese sehr genau erhalten werden.

Für den elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Verfahren im Einsatz, das „Tankblot System“ und das „Semidryblot System“

Nach dem elektrophoretischen Transfer von Protein auf Nitrocellulose müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Da Antikörper Proteine sind, würden sie sich sonst an jeder freien Bindungsstelle der Membran anhaften und einen spezifischen Nachweis von Antigen unmöglich machen.

Dieses Blockieren freier Bindungsstellen (blocking) wird mit einem nicht für die Antikörper (antibodies=AB) erkennbares Protein bewerkstelligt. Oft wird BSA (bovine serum albumin) verwendet. Diese Proteine binden an sämtliche freien Bindungsstellen der Membran. Damit bleibt den Antikörpern nur noch die Möglichkeit an Epitope ihrer entsprechenden Antigene zu binden.

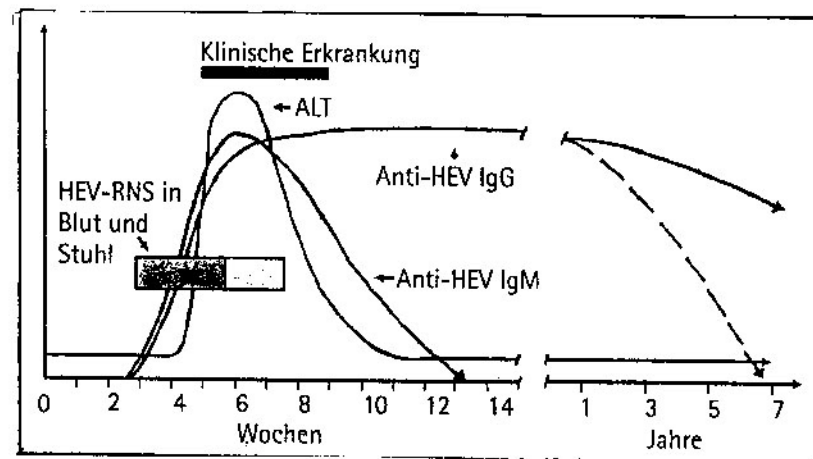
Um diese spezifische Bindung sichtbar zu machen muß der Antikörper (AB) mit einem Enzym gekoppelt sein, das eine Farbreaktion auslösen kann. Ein gebräuchliches Enzym ist Peroxydase aus Meeretich (HRP, horseradish peroxidase).

HRP kann verschiedene Substrate umsetzen, darunter Chlornaphthol, Minoethylcarbazol und Diaminobenzidin. Die Produkte bilden eine sichtbare Färbung an der Stelle des Antigen-Antikörper Komplexes.

3.2 Verfügbare Nachweismethoden für Hepatitis E und deren Aussagekraft

Die nachfolgende Nachweismethoden sind von FROESNER et al. 2001 modifiziert und bezüglich ihrer Aussagekraft überprüft worden (s. Abbildung 3.2.1).

Abbildung 3.2.1: Zeitpunkt des Auftretens und typischer Verlauf virusspezifischer Marker bei der Hepatitis E (nach FROESNER 2001)



3.2.1 Antikörper gegen Hepatitis E Virus (Anti-HEV)

Zur Zeit stehen käufliche Enzymimmunteste zum Nachweis von Anti-HEV zur Verfügung, die rekombinante Antigene des ORF2 und ORF3 des Burma- und des Mexiko-Referenzstammes enthalten (DAWSON et al. 1992). Anti-HEV-Teste zeigen meistens, aber nicht immer, schon bei Erkrankungsbeginn eine Positivität.

Anti-HEV ist nur bei etwa 80–90% der akuten Hepatitis Erkrankungen nachweisbar, bei denen die HEV-Infektion durch den Nachweis der HEV-RNS

mittels PCR gesichert werden kann (FROESNER et al. 1994). Immunologische Unterschiede zwischen den HEV-Isolaten in verschiedenen geographischen Gebieten könnten diese Diskrepanz erklären.

Anti-HEV ist nach einer Infektion oft nur kurzfristig nachweisbar, und kann wenige Wochen nach einer akuten Erkrankung bereits wieder negativ sein. (LI et al., 1994, GOLDSMITH et al., 1992; WORM, WURZER, und FROESNER, 1998). So zeigen bei Prävalenzuntersuchungen zur Ermittlung von Anti-HEV nicht alle Personen, die eine HEV-Infektionsanamnese vorweisen, eine Positivität der Anti-HEV.

Wegen des teilweise kurzfristigen Nachweises des Anti-HEV-IgG nach einer Infektion, sind bei Prävalenzuntersuchungen von gesunden Personen viele schwach positive oder grenzwertige Testergebnisse zu registrieren. Deshalb ist es schwierig einen Grenzwert der Positivität beim Anti-HEV-IgG-Test festzulegen, der eine sichere Unterscheidung zwischen spezifisch-positiven und unspezifisch-reaktiven Testergebnissen gewährleistet. Deshalb muß bei Prävalenzuntersuchungen die Spezifität positiver Testergebnisse mit weiteren Bestätigungsteste überprüft werden.

3.2.2 IgM Antikörper gegen HEV

Das Anti-HEV-IgM ist meistens für etwa 6 bis 7 Wochen und nicht länger als 3 Monaten nach einer Infektion nachweisbar (BRYAN et al., 1994; GOLDSMITH et al., 1992). Eine Positivität des Anti-HEV-IgM-Tests ist beweisend für eine frische Infektion.

Wie beim Anti-HEV-IgG Test sind auch mit dem Anti-HEV-IgM Test nur etwa 80% der diagnostizierten Hepatitis E Erkrankungen nachweisbar (GOLDSMITH et al., 1992). So schließt ein negatives Anti-HEV-IgM Ergebnis bei einem Patienten mit akuter Hepatitis eine frische Hepatitis E nicht sicher aus.

Die Feststellung, daß in nicht endemischen Gebieten mit den zur Verfügung stehenden Nachweismethoden sowohl Anti-HEV-IgG als auch Anti-HEV-IgM nur in etwa 80–90% bzw. 90% der Fälle im Serum von Patienten nachweisbar ist, scheint in der Tatsache zu liegen, daß diese Teste vorwiegend auf den Burma- und Mexiko-Isolate basieren. Diese Isolate zeigen einen großen Sequenzunterschied und dadurch

auch immunologische Unterschiede im Vergleich zu den Isolaten in den nicht endemischen Gebieten (WORM et al. 2000)

3.2.3 Nachweis von HEV-RNS mittels PCR

Eine frisch Hepatitis E Infektion wird durch den Nachweis von HEV-RNS mittels PCR bewiesen (Mc CAUSTLAND et al. 1991, SCHLAUDER et al. 1993). Der Nachweis kann sowohl im Stuhl als auch im Blut der Erkrankten erfolgen. Jedoch nur in der Hälfte der Fälle gelingt dieser Nachweis am Erkrankungsbeginn. Eine Positivität kann bis zu drei Wochen nach Erkrankungsbeginn erhalten bleiben. Es wurde festgestellt, daß bei experimentell infizierten Affen ein HEV-RNS-Nachweis im Blut länger als im Stuhl möglich sei. Auch wenn dieses beim Menschen noch nicht systematisch untersucht worden ist, sollte trotzdem auch beim Menschen dem HEV-RNS-Nachweis im Blut der Vorzug gegeben werden.

Stammt das Untersuchungsmaterial nicht aus den ersten Erkrankungstagen, schließt ein negatives Testergebnis auf HEV-RNS eine frische HEV Infektion nicht aus, denn die vorhandene HEV-RNS-Konzentration kann relativ gering sein. Hier wird ein positives Testergebnis meist nur mit der hochempfindlichen „nested“ PCR erhalten.

Die Sequenzunterschiede, die zwischen den Gruppen der HEV-Isolate vorhanden sind und das Fehlen von stark konservierten Genregionen macht es schwierig Primer zu entwerfen, die das Erfassen von allen Viren-Isolaten möglich machen. Besonders schwierig ist dieses bei Infektionen, die in den nicht endemischen Gebieten auftreten, da diese HEV-Isolate noch wenig charakterisiert sind. Deshalb ist wegen schlechter Bindung der Primer mit falsch negativen PCR-Ergebnissen zu rechnen.

3.2.4 Bestätigung Anti-HEV-positiver Befunde mittels Western Blot

Die Tatsache, daß bei Anti-HEV Prävalenzuntersuchungen von gesunden Personen, häufig grenzwertige Testergebnisse ermittelt werden, macht die Absicherung der Spezifität positiver Testergebnisse durch einen Bestätigungstest

nötig. Als Bestätigungstest wird der Western Blot benützt. Der Western Blot erlaubt den Nachweis von Anti-HEV der IgG- oder der IgM-Klasse mit Hilfe rekombinierter Strukturproteine des HEV, die vom offenen Leserahmen 2 und 3 (ORF2 und ORF3) kodiert werden.

Bei einer akuten HEV-Infektion werden fast immer Antikörper der IgM- und der IgG-Klasse gegen das ORF3 nachgewiesen. Bei einer abgelaufenen Infektion sind diese Antikörper selten vorhanden. Antikörper der IgG-Klasse gegen das 3'-Ende (C-terminal) des ORF2 sind am häufigsten bei einer abgelaufenen HEV-Infektion vorhanden, gefolgt von Antikörpern gegen das 5'-Ende (N-terminal) des ORF2. Am seltensten werden Antikörper gegen die Mitte des ORF2 gebildet.

Sind im IgM-spezifischen Western Blot mindestens 2 Banden, von denen die eine die ORF3-Bande ist, oder 3 Banden nachweisbar, ist eine frische Infektion bestätigt. Sind im IgG-spezifischen Western Blot mindestens 2 Banden vorhanden so kann eine abgelaufene Infektion als gesichert gelten.

3.2.5 Diagnostische Anwendung der Sequenzvariation von HEV-RNS

Mehrere HEV-Isolaten sind komplett kloniert und sequenziert worden, und eine Reihe von weiteren Teilsequenzen ist aus Gendatenbanken abrufbar. Asiatische HEV-Isolate der Gruppe I weisen einen Nukleotidunterschied von etwa 5-10% auf. Die der gleichen Gruppe angehörenden afrikanische Isolate zeigen eine Differenz von den asiatischen um etwa 10–15%. Die zu den anderen Gruppen gehörenden Isolate aus Mexiko (Gruppe II) den USA (Gruppe III) und aus China (Gruppe IV) differieren um jeweils etwa 25% von den Asia-Isolaten. So ist es möglich durch die Sequenzierung eines kurzen PCR-Produktes auf die geographische Herkunft des HEV zu schließen.

Geht eine Epidemie von einer Quelle aus, kann eine einheitliche Sequenz festgestellt werden (FROESNER et al. 1994). So kann die Sequenzierung von PCR-Produkten im Rahmen einer Epidemie das Vorliegen einer bestimmten Infektionsquelle sichern oder ausschließen. Haben Infektionen keinen Zusammenhang, so finden sich wegen der hohen Sequenzvariation des Virus immer deutlich unterschiedliche PCR-Produkte.

3.3 Untersuchungsgang bei der Diagnose der akuten und abgelaufenen Hepatitis E

3.3.1 Akute Hepatitis E

Da Hepatitis E Infektionen in den Industrieländern relativ selten auftreten, sollte bei einer akuten Hepatitis ein Anti-HEV-Nachweis-Test aus Kostengründen nur dann im initialen Suchprogramm durchgeführt werden, wenn eine Reiseanamnese in ein Endemiegebiet vorliegt. Alle Patienten mit akuter Hepatitis, bei denen im initialen Suchprogramm eine Hepatitis A, B und C ausgeschlossen werden kann, sollten weiter auf Anti-HEV-IgG untersucht werden. Ist der Anti-HEV-IgG-Test positiv muss die Diagnose der akuten Hepatitis E durch weitere Tests abgesichert werden.

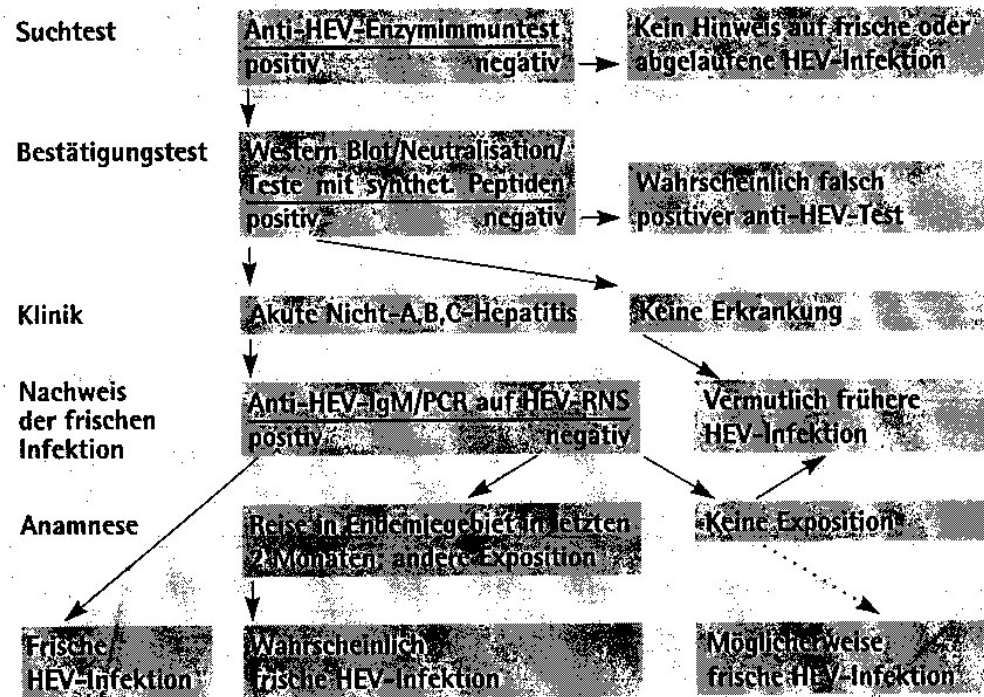
Ist der Anti-HEV-IgM-Test oder die HEV-RNS mittels PCR positiv, kann eine Hepatitis E als bewiesen angesehen werden. Ein negatives Ergebnis schließt jedoch eine Hepatitis E nicht aus, wie oben diskutiert worden ist. Ist eine Reise in ein Endemiegebiet innerhalb der maximalen Inkubationszeit von 65 Tagen zu verzeichnen, so ist bei Patienten mit Nicht-A-C-Hepatitis eine Hepatitis E immer noch möglich. Selbst ohne Reiseanamnese, allerdings sehr selten, ist eine Hepatitis E möglich.

Abbildung 3.3.1 zeigt das diagnostische Vorgehen bei der Diagnose einer akuten oder abgelaufenen HEV-Infektion.

3.3.2 Abgelaufene Hepatitis E

Wie erwähnt werden bei Prävalenzuntersuchungen häufig grenzwertig positive Anti-HEV-Tests festgestellt, die sich im Retest oft nicht bestätigen lassen. Ein Anti-HEV-Test, der wiederholbar ein positives Ergebnis zeigt, sollte mittels Anti-HEV Western Blot auf Spezifität geprüft werden.

Abbildung: 3.3.1: Diagnostisches Vorgehen beim Nachweis einer akuten oder abgelaufenen HEV-Infektion (aus FROESNER et al. 1994)



4. EIN ÜBERBLICK DER STUDIEN ÜBER HEV-ISOLATE, SCHWEIN- ISOLATE UND IHRE BEZIEHUNGEN

Das HEV ist in vielen Entwicklungsländern die häufigste Ursache einer enteral übertragenen Hepatitis. Viele Epidemien erfolgten nach Verschmutzungen des Trinkwassers. Die Hepatitis E Erkrankung betrifft hauptsächlich junge Erwachsenen und hat eine Mortalität von etwa 2%. Ausnahme sind schwangere Frauen, wo eine Sterblichkeitsrate von etwa 20% beobachtet wird. Zwischen großen Epidemien treten häufig sporadische akute Hepatitis E Erkrankungen auf. Subklinische Infektionen treten vorwiegend bei Kindern auf. Das Reservoir des Virus zwischen den Epidemien kann in HEV-infizierten Personen mit einem subklinischen Verlauf und/oder in den HEV-infizierten Tieren liegen. Die Hepatitis E Erkrankung wird in den Industrieländern selten beobachtet, und die meisten Fälle treten dort bei Personen auf, die in Regionen gereist waren, in denen die Infektion hoch endemisch ist. Jedoch sind vereinzelt sporadische Fälle von akuter Hepatitis E Erkrankung berichtet worden, die Personen aus Industrieländern betrafen, die keine Reiseanamnese in ein Endemiegebiet aufwiesen.

In den Industrieländern, wo Hepatitis E nicht hochendemisch ist, zeigt sich unter gesunden Personen (Blutspender) ein Anti HEV-Prävalenz von 1 bis 5%. In einer Studie zeigte sich sogar bis zu 28% der Blutspender positiv ((THOMAS et al. 1997, KARENTYI et al. 1999, MAST et al. 1997, MENG et al. 2002, PSYCHOGIOU et al. 1996, KNODLER et al. 1994, FROESSNER et al.1999, NUBLING et al. 2002, ZANETTI et al. 1994, PAVIA et al. 1998, MATEOS et al. 1998, TARRAGO et al. 2000, ZAAIJER et al. 1995, YOO et al. 2000, BERNAL et al. 1996).

Betrachtet man das sporadische Auftreten akuter Hepatitis E Erkrankungen in Industrieländern, so besteht eine Diskrepanz zu der hohen Anti-HEV Prävalenzrate unter der gesunde Bevölkerung dieser Länder. Als Ursache dieser Diskrepanz wird ein Tierreservoir für das HEV diskutiert.

In den letzten Jahren wurden aus den Industrieländern immer wieder über Fälle von akuten HEV-Erkrankungen berichtet. Meist handelte es sich um Personen, die in

ein für HEV hochendemisches Gebiet gereist waren. Es wurde aber auch über akute HEV Erkrankungen berichtet, bei denen keine Reiseanamnese vorhanden war.

1998 berichteten SCHLAUDER et al. aus der USA über zwei akute HEV-Erkrankungen in Minnesota und Tennessee. Der Patient in Minnesota hatte keine Reise außerhalb der USA unternommen, während der Patient in Tennessee über eine Reise nach Mexiko berichtete. Die Sequenzanalyse dieser zwei Isolate US1 und US2 zeigte überraschenderweise keine Identität mit den bis dahin bekannten HEV-Isolaten aus Asien (Genotyp 1) und Mexiko (Genotyp 2), sondern eine Ähnlichkeit von mehr als 92% mit dem 1997 beschriebenen amerikanischen Schwein-HEV-Isolat SwUS. Die Identität mit den HEV-Isolaten aus Mexiko- und Burma betrug weniger als 74%. Diese Isolate wurden deshalb einem neuen 3. Genotyp zugeordnet.

In Taiwan charakterisierte HSIEH 1999 ein neues HEV-Isolat von einem Patienten mit akuter Hepatitis E ohne Reiseanamnese, das sich von allen anderen HEV-Isolaten unterschied, zeigte aber mit anderen HEV-Isolaten vom Schwein in Taiwan eine Nukleotidsequenzidentität von 98,4%.

ZANETTI et al. berichteten 1999 über ein neues Isolat aus Italien, von einem Patienten ohne Reiseanamnese stammte und das eine Nukleotidsequenzidentität mit den anderen HEV-Isolaten von nur 79,5 bis 85,8% zeigte.

1999 untersuchten SCHLAUDER et al. noch drei neue HEV-Isolate aus Europa, die ebenfalls von Patienten ohne Reiseanamnese stammten. Zwei Isolate wurden in Griechenland und eines in Italien gewonnen. Die griechischen Isolate zeigten eine geringe Nukleotidsequenzidentität mit dem italienischen Isolat. Aber auch zwischen den zwei griechischen Isolaten bestand nur eine geringe Identität. Diese Isolate wurden als Greece 1, Greece 2 und Italien-Isolat bezeichnet. Sie zeigen die größte Ähnlichkeit mit Isolaten des 3. Genotyps.

Auch aus Österreich wurde von WURM et al. über ein neues HEV-Isolat berichtet. Das Austria-Isolat, Au 1, zeigte beim Vergleich der Nukleotidreihenfolge eine Identität von 76,6 bis 78,45% mit den Isolaten aus endemischen Regionen und 84,6 bis 87,9 zu den Isolaten aus nicht endemischen Gebieten.

Die Herkunft dieser neuen HEV-Isolaten, die in den Industrieländern von Patienten mit akuter HEV-Erkrankung ohne Reiseanamnese in ein Hochendemiegebiet, gekennzeichnet wurden, ist noch nicht endgültig geklärt. Die nachgewiesene Ähnlichkeit dieser neuen HEV-Isolate des Menschen mit HEV-Isolaten vom Schwein und der Nachweis des Vorhandenseins von HEV auch in anderen Tierarten, macht ein Tierreservoir des HEV möglich, von dem aus Menschen im Rahmen einer Zoonose infiziert werden könnten.

Anfang der 90ziger Jahre wurde die Hypothese gestellt, daß Tiere als Reservoir für HEV dienen könnten. 1995 untersuchte CLAYSON Schweine in Katmandu/Nepal, ein für Hepatitis E hochendemisches Gebiet, mit der Frage ob auch bei diesen Tieren eine Hepatitis E Infektion vorhanden war. Es wurden 55 Schweine untersucht. Untersuchungsmaterial waren Serum oder Stuhlproben. Unter den 55 Schweine wurden 18 mit HEV-spezifischen Antikörpern ermittelt. CLAYSON stellte die Hypothese auf, daß HEV ein zoonotisches Virus ist und, daß Schweine ein Reservoir für das HEV darstellen könnten.

Inzwischen wurden Anti-HEV in mehreren Tierarten aus verschiedenen Erdteilen festgestellt. So wurden Anti-HEV in Vietnam, ein für HEV hochendemisches Gebiet, in 44% der untersuchten Hühner, in 36% der Schweine, in 27% der Hunde und in 9% der Ratten ermittelt (TIEN et al. 1997). In den USA wurden Anti-HEV bei Ratten in 77% in Maryland, in 90% in Hawaii und in 44% in Louisiana festgestellt (KABRANE-LAZIZI et al. 1999). In Somalia, Turkmenistan und Tadjikistan, also Länder die hochendemische Gebiete für HEV sind, zeigte sich bei Kühen eine Anti-HEV Prävalenzrate von 29 bis 67%, im Vergleich zu 12% bei Kühen in Ukraine, ein für HEV wenig endemisches Gebiet. Auch Schafe und Ziegen zeigten in Turkmenistan ein Anti-HEV Prävalenz von 42–67% (FAVOROV et al. 1998). In Indien wurde eine Anti-HEV Seropositivität von 4,4 bis 6,9% bei Kühen, von 54,6 bis 74,4% bei Schweinen und von 2,1 bis 21,5% bei Nagetieren festgestellt (ARANKALLE et al., 2001). Werden diese Daten zusammenfassend betrachtet, so könnte daraus gefolgert werden, daß diese Tiere dem HEV ausgesetzt sind und, daß HEV eine Zoonose darstellen könnte.

Im Jahre 1997 wurden in den USA von MENG et al. Schweine aus 15 Schweinherden auf das Vorhandensein von HEV-Antikörpern untersucht. Das Alter

der Schweine erstreckte sich von 6 Wochen bis älter als 3 Jahren. MENG stellte fest, daß Anti-HEV in mehr als 80% der Schweine, die älter als 3 Monate waren, vorhanden war. Die Schweine waren mit dem HEV infiziert worden, sie zeigten aber keine klinische Symptomatik. Im Rahmen einer Infektion konnte vor der Serokonversion eine Virämie nachgewiesen werden. Die Leberbiopsien zeigten mikroskopische Veränderungen der Hepatozyten. Das vom Schwein isolierte HEV, das als SwHEV bezeichnet wurde, zeigte mit den menschlichen HEV-Isolaten Sar 55 (Asien) und Mexiko eine Nukleotidsequenzidentität von 79 bis 80% und eine Aminosäuresequenzidentität von 90 bis 92%.

MENG et al inokulierte bei einem experimentellen Versuch krankheitserregerfreie Schweine a) mit Serum das von natürlich mit HEV angesteckten Schweinen stammte und b) mit den menschlichen HEV-Isolaten Sar 55 und Mex 14 (Isolate aus Pakistan und Mexiko). Nach 4 bis 8 Wochen zeigten die mit Schwein-HEV (SwUS) intravenös infizierten Schweine eine Serokonversion. Die mit den Sar 55 und Mex 14 infizierten Schweine wurden nicht angesteckt. Bei einem nicht geimpften Schwein, das zusammen mit den geimpften Schweinen lebte, wurde ebenfalls das SwHEV festgestellt. Deswegen wurde eine Übertragung des HEV in den Schweinen durch direkten Kontakt in Betracht gezogen.

1998 wurde in den USA von SCHLAUDER et al. das US1-HEV-Isolat von einem Patienten, der keine Reiseanamnese in ein Endemiegebiet aufwies, charakterisiert. Das HEV-US1-Isolat war von den anderen bis dahin bekannten menschlichen HEV-Isolaten sehr verschieden, da eine Nukleotididentität von nur 76.8 bis 77,5% feststellbar war. Die aus HEV-US1 gewonnene spezifische Peptide machten die Gewinnung eines zweiten HEV-Isolats möglich, des US2-Isolats, das ebenfalls von einem Patienten mit akuter Hepatitis stammte. Weitere Vergleiche zeigten, daß das von MENG et al. 1997 entdeckte Schwein-HEV-Isolat (SwUS) eine Nukleotidsequenzidentität mit den US1 und US2 Isolaten von 92% und eine Aminosäuresequenzidentität von $\geq 99\%$ hatte.

Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen SwUS-HEV vom Schwein und den HEV-Isolaten US1 und US2 vom Menschen stellten diese Viren eindeutig einen eigenen Zweig des phylogenetischen Baums des HEV dar. MENG et al. gingen deshalb 1998 der Frage nach, ob SwUS-HEV Menschen anstecken könnten. Es

wurden Rhesusaffen und ein Schimpanse, als Stellvertreter für den Menschen, mit SwUS-HEV inokuliert. Außerdem wurden im umgekehrten Experiment krankheitserregerfreie Schweine experimentell mit dem US2-HEV-Isolat inokuliert. Sowohl die Primaten, die mit SwUS-HEV-Isolat inokuliert waren, als auch die mit dem US2-HEV-Isolat inokulierten Schweine wurden infiziert. Dieser Befund zeigt, daß SwUS-HEV von einer Spezies zu einer anderen Spezies übertragen werden kann und, daß möglicherweise ein Teil der HEV-Erkrankungen des Menschen durch Übertragung des HEV vom Schwein im Sinne einer Zoonose verursacht wird.

Das HEV der Schweine ist mit großer Wahrscheinlichkeit weltweit verbreitet. Arbeiten in verschiedenen Erdgebieten bestätigen dieses.

1999 versuchten MENG et al. das Potential der Schweine als globales Reservoir für HEV auszuloten. Anti-HEV wurden in Schweinen von 4 verschiedenen Länder untersucht. Zwei dieser Länder, China und Thailand, sind für HEV hoch endemische Gebiete, die zwei anderen, Kanada und Korea, gelten als wenig endemisch. Es wurde festgestellt, daß die Schweinherde in alle vier Länder Schweine erhielten, die Anti-HEV-IgG positiv waren, obwohl der prozentuelle Anteil an seropositiven Schweine große Schwankungen von Herde zu Herde zeigte. Auch eine begrenzte Zahl von Schweinhändlern in den zwei endemischen Gebieten wurde untersucht und die meisten waren seropositiv für HEV. So wurde vorgeschlagen, daß HEV in den Schweinen enzoonotisch ist, unabhängig davon ob HEV in der menschlichen Bevölkerung verbreitet ist.

HSIEH et al. stellten bei der Untersuchung von 275 Schweinen aus zehn Bauernhöfen in Taiwan eine Anti-HEV-Prävalenz von 37% fest. Eine Nukleotidfolge innerhalb des Strukturproteins ORF2 des HEV-Genoms der Schweine wurde geklont und mit einem HEV-Isolat, das bei einem Patienten mit akuter Hepatitis E ohne Reiseanamnese entdeckt worden war, verglichen. Der Vergleich ergab eine Identität von 97.3% zwischen den zwei Isolaten. Phylogenetische Analysen zeigten, daß sich in Taiwan HEV-Isolate vom Schwein und vom Menschen deutlich von allen bekannten Isolaten unterschieden, einschließlich des SwUS-Isolates.

Des weiteren untersuchten WU et al. in Taiwan Seren von 235 Schweine und von Patienten mit akuter HEV Infektion ohne Reiseanamnese. 1,3% der Schweine hatten

nachweisbare Schweine-HEV-RNS. Sequenzanalysen zeigten, daß zwischen HEV-Isolate vom Schwein und vom Menschen eine Nukleotitreihenfolge-Identität von 84-95% bestand. Der Vergleich mit Isolate aus anderen Gebieten zeigte eine Identität von 72-79% .

GARKAVENKO et al. untersuchten das Vorhandensein des Anti-HEV in Schweinen von Neu Seeland. Zwanzig der zweiundzwanzig geprüften Herde (91%) zeigten eine Positivität für Anti-HEV. Der phylogenetische Stammbaum des HEV-Isolats von Neu Seeland zeigte, dass dieses am nächsten mit dem menschlichen Europa-Isolat It-1 verwandt war. Ein Vergleich mit dem SwUS-Isolat ergab eine Ähnlichkeit im ORF1 von 83-88%. So ist das Neu Seeland-Isolat bisher das einzige Asien-Isolat, das der Europa/US Gruppe der HEV-Isolate zugeordnet werden konnte.

YOO et al. untersuchten in Kanada Serumproben von 998 klinisch gesunden Schweinen aus unterschiedlichen Regionen auf das Vorhandensein von Anti-HEV. Das Alter der Schweine war etwa 6 Monate. 594 der Proben (59.4%) waren positiv. Es bestanden Prävalenzunterschiede zwischen den verschiedenen Regionen. In Quebec waren in 88.8% Serumantikörper vorhanden, in Ontario 80,1%, in Alberta und Sashatschewan 38,3%. Die Nukleotidsequenzfolge-Analyse zeigte eine Identität zwischen dem kanadischen Schwein-Isolat SK3 und dem SwUS-Isolat von nur 85,8%. Es wurde angenommen, daß genotypische Varianten des Schwein-HEV in Nordamerika existieren.

In Japan stellten OKAMOTO et al. eine HEV-RNS Positivität in 3% der 95 untersuchten Schweine im Alter von 60 bis 90 Tagen fest. Die Isolate wurden molekular analysiert und es wurde eine Identität von 83-87% mit den US1-, US2- und SwUS-Isolaten festgestellt. Eines von drei Schwein-Isolate, das SwJ70 Isolat, wurde in voller Länge sequenziert und mit dem in Japan vom Menschen stammenden Isolat JRA1, das von einem Patienten mit akuter HEV Erkrankung ohne Reiseanamnese stammte, verglichen. Es zeigte sich eine Identität in der Nukleotidreihenfolge von 89%. So konnte aus dieser Arbeit gefolgert werden, daß auch in Japan Schweine mit dem HEV infiziert sind und, daß diese als Reservoir für HEV-Infektionen des Menschen dienen könnten.

HUANG et al. untersuchten Schweine aus verschiedene geographische Regionen der USA mit der Frage ob es genetisch unterschiedliche Schwein-HEV-Isolate in den USA gäbe. Mittels einer neuen Universal-PCR wurden Stuhl- und Serumproben von Schweinen im Alter von 2 bis 4 Monaten, aus 37 unterschiedliche Farmen auf das Vorhandensein von HEV-RNS untersucht. 34 der 96 Schweine, d.h. 35%, und 20 der 37 Schweineherde, gleich 54%, waren HEV-RNS positiv. In 27 Schwein-Isolaten von unterschiedlichen Regionen wurde eine Teilsequenz des ORFs2 analysiert. Die 27 Schwein-Isolate hatten untereinander eine Sequenzidentität von 88 bis 100% und von 89-98% mit dem Prototyp SwUS. Mit den Taiwan-Isolaten betrug die Identität 74 bis 78% und mit den meisten menschlichen HEV-Isolate < 79%.

Um festzustellen ob Schweine eine Quelle von HEV-Infektion sind untersuchten WU et al. in Taiwan Seren von 235 Schweinen und von 5 Patienten mit akuter HEV-Infektion ohne Reiseanamnese. Drei der Schweine waren HEV-RNS positiv. Es bestand in Taiwan eine Identität der Nukleotidsequenz zwischen HEN-Isolaten vom Schwein und vom Menschen von 84 bis 95%, im Vergleich zu HEV-Isolaten aus anderen Regionen von nur 72 bis 79% .

Zwei Jahre später stellten WU et al. eine Übersicht über die Verbreitung des HEV unter Schweine verschiedenen Alters in Taiwan vor. Zwischen 1998 und 2000 wurden 54 Stuhl- und 521 Serumproben untersucht. Keines der 11 Schweine im Säuglingsalter (weniger als 2 Monate alt) war im Serum HEV-RNS positiv. Die höchste Prävalenzrate von 4,5% zeigten Schweine im Alter von 2 Monaten, gefolgt von 3 bis 4 Monaten alten Schweinen mit 1,8 % und von 5 bis 6 Monaten alte Schweine mit 1,2%. Keines der Schweine älter als 6 Monate war im Serum HEV-RNS positiv. 9% der 34 Stuhlproben der Schweine (Alter 3 bis 4 und 5 bis 6 Monate) waren HEV-RNS positiv. Die meisten HEV-Isolate vom Schwein wurden in Taiwan dem 4. Genotyp zugeordnet.

ARANKALLE et al. untersuchten in Indien Serumproben von 284 Schweinen auf das Vorhandensein von HEV-RNS und Anti-HEV-IgG. 42,9% waren Anti-HEV-IgG positiv und 4,6% HEV-RNS positiv. HEV-RNS Seren wurden sequenziert und phylogenetisch analysiert. Es stellte sich heraus, daß, obwohl die indischen HEV-Isolate vom Menschen dem Genotypus I (Asien-Isolate) angehören, die indischen Isolate vom Schwein dem Genotypus 4 zugeordnet werden müssen. Dies steht im

Gegensatz zu USA, Taiwan und Japan, wo HEV-Isolate von Mensch und Schwein dem gleichen Genotyp angehören.

FROESNER und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 1998 in Bayern/Deutschland, 237 Schweinen im Alter von 6 bis 8 Monaten. 76% der untersuchten Schweine zeigten eine Anti-HEV-IgG Positivität.

PINA et al. untersuchten in Spanien Serumproben von Patienten mit akuter Hepatitis, 48 Schweineserumproben, 6 Schweinestuhlproben und 12 Schlachthausabwasserproben auf das Vorhandensein von HEV-RNS. Drei Patienten waren HEV-RNS positiv. Die Nukleotidsequenzanalyse charakterisierte zwei Isolate mit einer Identität von 93,4%. Phylogenetisch waren die Spanien-Isolate mit dem Isolat Greece 1 aus Griechenland am nächsten verwandt. In den Proben aus dem Schlachthausabwasser wurde HEV-RNS gefunden, die eine Nukleotidähnlichkeit von 92 bis 94% mit den HEV-Isolaten vom Menschen besaß. Die Schweineserumproben wiesen eine Anti-HEV Prävalenz von 25%.

Vor kurzem untersuchten POEL et al. in den Niederlanden gepoolte Stuhlproben von Schweinen aus 115 Schweinezuchtbetrieben und 9 einzelne Stuhlproben von Schweinen mit Diarrhöe auf HEV-RNS. 25 der gepoolten Stuhlproben (22%) waren HEV-RNS positiv aber in keiner der einzelnen Proben wurde HEV-RNS gefunden. Für vier Isolate wurde die Nukleotidsequenz bestimmt. Der Vergleich der Isolate zeigte eine Sequenzidentität von 82,0 bis 95,5% im untersuchten Fragment von ORF1 und von 79,5 bis 92,7% im Fragment von ORF2. Vergleiche der niederländischen HEV-Isolate vom Schwein mit anderen Isolaten ergaben, daß zwei niederländische Schwein-Isolate (NLsw22 und NLsw122) eine Identität von 90,0 bis 90,9% mit den Isolaten US1, US2 und SwUS aus den USA haben. Das HEV-Isolat-NLsw50 vom Schwein zeigte eine Identität von 91,8 bis 93,1% mit den spanischen HEV-Isolaten vom Menschen und Schwein. Der Vergleich mit Isolaten aus endemischen Gebieten zeigte eine Identität von weniger als 79,8%.

Schon Anfang der 90ziger Jahre wurde der Frage nachgegangen ob HEV-Isolate von einer Spezies auch andere Spezies infizieren können.

1990 infizierten BALAYAN et al. russische Schweine experimentell mit einem HEV-Isolat, das von einem natürlich infizierten Patienten stammte. Das HEV-Isolat, das die Schweine in diesem Experiment ansteckte ist leider nicht sequenziert worden. So bleibt der letzte Beweis offen ob das HEV- Isolat, das die Schweine infizierte, tatsächlich vom Menschen stammte.

Der Beweis für eine Kreuz-Spezies Infektion wurde 1998 von MENG et al. erbracht. Nach der Entdeckung des vom Schwein stammenden HEV-Isolats SwUS wurde versucht, Schweine experimentell sowohl mit diesem Isolat als auch mit den von Menschen stammenden HEV Isolaten Sar 55 (Pakistan-Isolat) und Mex 14 (Mexiko-Isolat) zu infizieren. Als Quelle von SwUS wurden Serumproben von natürlich angesteckten Schweinen gesammelt. Die mit dem SwUS intravenös infizierte Schweine zeigten 4 bis 8 Wochen nach der Infektion eine Serokonversion in Form des Auftretens von Anti-HEV. Bemerkenswert war, daß bei einem nicht experimentell infizierten Schwein, das sich mit den geimpften Schweinen im gleichen Lebensraum befand, ebenfalls Anti-HEV feststellbar wurde, was zur Hypothese einer Kontaktübertragung führte. Bei den mit den Sar 55 und Mex 14 geimpften Schweine wurden keine Anti-HEV festgestellt.

Eine zweite Studie der Arbeitsgruppe von MENG erfolgte nach der Entdeckung der HEV-Isolate US1 und US2 beim Menschen durch SCHLAUDER et.al. und der Feststellung der großen Nukleotidsequenz-Ähnlichkeit zwischen diesen Isolaten und dem SwUS-Isolat vom Schwein. Zur Inokulation der Schweine wurden jetzt anstelle des SAR 55- und Mex 14-Isolats das neu entdeckte US2 Isolat benutzt. Zusätzlich wurden als Stellvertreter des Menschen zwei Rhesusaffen und ein Schimpanse mit dem SwUS-Isolat inokuliert. Die mit dem US2-Isolat vom Menschen inokulierten Schweine entwickelten Anti-HEV und zeigten HEV-Ausscheidung im Stuhl. Die Infektion verlief aber subklinisch. Es war kein klinischer oder biochemischer Beweis einer Hepatitis festzustellen, obwohl auch in der Galle HEV ermittelt wurde und damit eine HEV-Replikation in der Leber nachweisbar war. Die mit dem SwUS-Isolat inokulierten Rhesusaffen zeigten milde fokale nekrotisch-entzündliche Veränderungen in den Leberbiopsien und eine geringe Erhöhung der Serumtransaminasenwerte, was einer milden Hepatitis entspricht und eine Virenproduktion in der Leber bedeuten könnte. Der Schimpanse war klinisch gesund,

obwohl eine fäkale Ausscheidung der SwHEV und eine Anti-HEV-IgG Serokonversion registriert wurden. So war der Beweis für Kreuz-Spezies Infektionen erbracht. Die Möglichkeit, daß ein Teil der Infektion des Menschen durch HEV des Schweins ausgelöst wird, muß in Erwähnung gezogen werden.

ERKER et al. infizierten einen Cynomolgus Makaken mit dem US2-HEV-Isolat. Es wurden innerhalb von 2 bis 4 Wochen HEV-RNS im Serum und Stuhl nachweisbar, und es wurden erhöhte Werte der Transaminasen festgestellt. Anti-HEV trat 8 Wochen nach der Infektion im Serum auf.

HALBUR et al. teilten gesunde Schweine in drei Gruppen ein. Die erste Kontrollgruppe wurde nicht inokuliert. Die zweite Gruppe wurde mit dem SwUS-HEV-Isolat und die dritte Gruppe mit dem US2-HEV-Isolat inokuliert. Alle inokulierten Schweine entwickelten Anti-HEV. In allen drei Gruppen gab es keinen Hinweis auf eine klinische Erkrankung und es wurde keine Erhöhung der Leberenzyme festgestellt. Multifokale Hepatitis und fokale hepatozelluläre Nekrosen wurden in der Mehrzahl der Schweine beobachtet. Der Schweregrad schwankte von sehr milder bis zum sehr starker Ausprägung. Eine sehr milde Hepatitis zeigte die erste Gruppe, eine milde die zweite und eine sehr starke die dritte Gruppe. HEV-RNS wurde durch PCR im Stuhl, im Lebergewebe und in der Galle der inokulierten Schweine nachgewiesen. Basierend auf diesen Feststellungen, wurde die Frage gestellt, ob Schweineleber oder Leberzellen von Schweinen, die mit HEV infiziert sind, eine Gefahr der Übertragung von HEV vom Schwein auf den Menschen im Rahmen einer Xenotransplantation darstellen.

KASORNDORBUA et al. inokulierten 3 Wochen alte Schweine entweder mit Gewebekomogenaten aus Leber, Innereien, Pankreas und Skelettmuskulatur, oder mit Stuhlproben von experimentell mit SwUS-HEV infizierten Schweinen. Die Schweine, die mit Leberhomogenaten inokuliert wurden entwickelten Anti-HEV, und SwUS-HEV-RNS wurden in ihren Seren gefunden. Die Schweine, die mit den anderen Homogenaten inokuliert wurden, entwickelten keine Anti-HEV. Es wurde diskutiert, daß möglicherweise die Gefahr der Übertragung des Schwein-HEV über Lebergewebe von angesteckten Schweinen auf den Menschen besteht.

Die Charakterisierung von HEV-Isolaten der Schweine und die dabei festgestellte große Ähnlichkeit der Nukleotidsequenz mit HEV-Isolaten des Menschen aus der gleichen geographischen Regionen, sowie die Fähigkeit des Schwein-HEV über Spezies anzustecken, führt zur Hypothese, daß Tiere die Quelle einer HEV-Infektion des Menschen sein könnten. Personen, die mit Tieren und vor allem mit Schweinen beruflichen Kontakt haben, wären einer größeren Gefahr einer zoonotischer HEV-Infektion ausgesetzt, als die normale Bevölkerung. Da das HEV ein relativ neues Virus in der Hepatitisvirenliste ist und da das Vorhandensein von HEV beim Schwein und dessen hohe Identität mit HEV des Menschen ebenfalls erst seit kurzer Zeit festgestellt ist, liegen bisher nur wenige Untersuchungen zur HEV-Exposition bei Tierkontakt, und insbesondere bei Kontakt mit Schweinen, vor.

KARENTNYI et al. stellten 1999 in einer Studie eine Beziehung zwischen HEV Durchseuchung und einer beruflichen Exposition fest. Sie verglichen Seren von Personen, die in Department of Natural Resources (DNR) in Iowa/USA beschäftigt waren, mit Seren von Blutspendern auf das Vorhandensein von Anti-HEV-IgM und IgG. Es wurde festgestellt, daß das Personal vom DNR mit 5,7% eine höhere Anti-HEV-IgG Prävalenz als die Gruppe der Blutspender.

1999 untersuchten HSIEH et al. in einer Studie in Taiwan die Seroprävalenz des Anti-HEV-IgG bei 20 Schweinefleischhändlern und 50 Kontrollpersonen mit der Frage einer möglichen erhöhten Übertragungsgefahr des Schwein-HEV bei Personen, die beruflichen Kontakt mit den Schweinen haben. Es wurde festgestellt, daß die Gruppe der Schweinefleischhändler eine Anti-HEV-IgG Prävalenz von 15% aufwies, im Vergleich zu 8% in der Kontrollgruppe.

Eine höhere Anti-HEV Prävalenz zeigten auch Schweinezüchter im Vergleich zu Personen ohne berufliche Exposition gegenüber Schweinen bei einer Studie von DOBRENIUC et al. in Moldovien, ein Land ohne berichtete Fälle von Hepatitis E. Die Prävalenz von Anti-HEV war bei den Schweinezüchtern mit 51,1% höher als in der Kontrollgruppe mit 24,7%.

Auch MENG et al. stellten eine höhere Prävalenz des Anti-HEV bei Tierärzten, die beruflichen Kontakt mit Schweinen hatten, im Vergleich zu normalen Blutspendern fest. Die Untersuchung wurde in verschiedene US-Staaten

durchgeführt. Es wurden rekombinante Antigene vom SwUS-HEV-Isolat des Schweins und vom menschlichen Sar 55-Isolat benutzt. 26% der Tierärzte hatten Antikörper gegen Sar 55- und 23% gegen SwUS-Proteine. Demgegenüber waren 18% beziehungsweise 17% der Blutspender positiv. Tierärzte zeigten also eine etwa 1,5 mal höhere Prävalenz von Anti-HEV als gesunde Blutspender.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die Anti-HEV-Prävalenz bei Schweinen in Nordgriechenland zu ermitteln und nach Anhaltspunkten für eine Übertragung des HEV vom Schwein auf den Menschen zu suchen. Dazu wurde die Prävalenz von Anti-HEV im Schlachthofpersonal, Schweinezüchtern und Blutspendern der gleichen Region ermittelt und mit dem Grad und der Dauer der Exposition gegenüber Schweinen in Beziehung gesetzt.

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1 Charakterisierung des Untersuchungsmaterials

Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen Hepatitis E in Seren von Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schlachtschweine.

Die Untersuchung ist in Griechenland durchgeführt worden. Im Zeitraum von Januar bis Februar 2002 wurden vier Schlachthöfe in vier Präfekturen in Zentralmakedonien/Nordgriechenland besucht. Die vier Präfekturen Kilkis (Hauptstadt Kilkis), Imathia (Hauptstadt Veria), Serres (Hauptstadt Serres) und Thessaloniki (Hauptstadt Thessaloniki) grenzen miteinander.

Insgesamt sind 290 Blutproben gesammelt worden. Ihre Herkunft war wie folgt:

- 72 Blutproben von Personen die als Schlachter in den Schlachthöfen tätig waren- darunter auch vier Tierärzte, die für den jeweiligen Schlachthof verantwortlich waren.
- 15 Blutproben von Schweinezüchtern in den gleichen Präfekturen
- 108 Blutproben aus den Blutbanken von zwei Krankenhäuser in Thessaloniki (das Hippokration- und das Theagenion-Krankenhaus). Die Blutspenderabteilungen dieser Krankenhäuser werden hauptsächlich durch Blutspenden von Personen versorgt, die größtenteils im Raum von Zentralmakedonien leben d.h. im gleichen Gebiet, aus dem auch das Schlachthauspersonal und die Schweinezüchter.
- 95 Blutproben von zur Schlachtung herangeführten Schweinen mit einem Alter von 5 bis 6 Monaten aus dem oben genannten Schlachthöfen.

Beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern wurden das Lebensalter und die Dauer der Berufstätigkeit abgefragt und niedergeschrieben.

Das Lebensalter des Schweinhofpersonals und der Schweinzüchter erstreckte sich von 16 bis 70 Jahren. Die Zeit, die das Schlachthofpersonal und die Schweinzüchter beruflich mit Schweinen Kontakt hatten war von 2 Monaten bis 40 Jahren.

Die Blutproben wurden zentrifugiert und die Seren wurden bis zur Untersuchung bei -20°C eingefroren.

Abbildung 5.1: Landkarte von Griechenland



5.2 Untersuchungsmethode

Für diese Arbeit wurde die Untersuchung der Serumproben auf das Vorhandensein von Anti-HEV mit dem *recomb*Blot HEV-IgG der Firma MIKROGEN (München) durchgeführt.

Der *recomb*Blot HEV-IgG ist ein qualitativer In-vitro-Test zum Nachweis und zur Identifizierung von IgG-Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus im Serum oder Plasma. Im Unterschied zu Enzymimmunoassays oder Spotttests erlaubt der Test, durch die elektrophoretische Auftrennung der Antigene, eine sichere Identifizierung von spezifischen Antikörpern gegen einzelne HEV-Peptide.

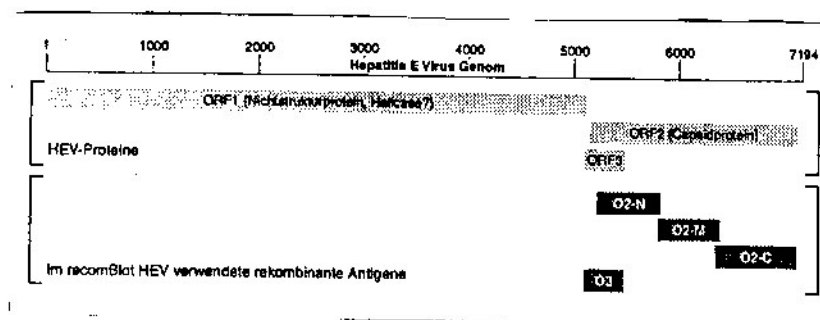
5.2.1 Testprinzip

Beim Western Blot werden vier rekombinant hergestellte HEV-Teilproteine verwendet. Diese HEV-Teilproteine sind:

- ORF 2 N-terminal-Peptid, Nukleotid 5220-5820
- ORF 2 Mitte-Peptid, Nukleotid 5804-6390
- ORF 2 C-terminal-Peptid, Nukleotid 6350-7130 und
- ORF 3-Peptid, Nukleotid 5100-7130.

Diese vier HEV-Teilproteine sind von der Gensequenz eines in Madras/Indien isolierten Hepatitis E-Virus abgeleitet (Genbank-Nummer X99441). Sie werden mittels Polymerasen-Ketten-Reaktion nach reverser Transkription (rt PCR) isoliert, amplifiziert und in prokaryontische Expressionsvektoren kloniert. Die Expression erfolgt in *E.coli* Expressionsstämmen. Anschließend werden die Antigene hoch aufgereinigt. Diese Aufreinigung erfolgt mit Q-Sepharose FF in 8M Urea als Capture Schritt, gefolgt von weiteren Anionen- und oder Kationenaustauschern, sowie hydrophobe Interaktionschromatographie als intermediäre oder Feinreinigungsschritte. ORF 3 wird zusätzlich über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Abbildung 5.2.1.1: Lokalisation und Anordnung der offenen Leserahmen (ORFs) des HEV und die für den Western Blot exprimierten HEV-Peptide des ORF2 und ORF3 (nach FROESNER)



Die verwendeten und wie oben erwähnt gewonnenen und gereinigten rekombinanten Antigene werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die HEV-Proteine werden dann elektrophoretisch von Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western-Blotting). Die Membran wird anschließend zur Blockierung freier Bindungsstellen mit einer Proteinlösung inkubiert, gewaschen und nach Zerschneiden in Streifen in Röhrchen verpackt.

Zum Nachweis von HEV-spezifischen Antikörpern werden die Streifen mit den verdünnten Serum-Probe inkubiert, wobei die Antikörper sich auf die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend abgewaschen und die Streifen in einer zweiten Inkubation mit Anti-human-IgG inkubiert, das mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Reaktivität gegen eines der HEV-Proteine gefunden wird, so erscheint diese als dunkle Bande auf dem Streifen.

Als Reaktions-Kontrolle ist am oberen Ende der Streifen eine Bande mit Anti-human-Immunglobulin aufgetragen, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muß.

Der Reagenzansatz des *recom*Blot HEV-IgG-Tests enthält:

- Röhrchen mit Westrn-Blot-Teststreifen beschichtet mit HEV-Antigenen.
- Wasch- bzw. Verdünnungspuffer (fünffach konzentriert). Enthält Tris-Puffer, NaCl, Tween-20 0,01, 0,1% Oxypyrion, Protein.
- Schwachpositive Serumkontrolle-IgG humaner Ursprung, Anti-HIV-1/2, Anti-HCV und HBsAg negativ, enthält 0,1% MIT, und 0,1% Oxypyrion.
- Anti-human-IgG Konjugat
- Von Kaninchen, enthält NaN₃.
- TMB Substratlösung, enthält 0,008% Cathon
- Inkubations-Schalen
- Entwickelter Kontrollstreifen (chargenspezifisch)

Herstellung der Lösungen

a) Herstellung des Waschpuffers

Das Waschpuffer-Konzentrat wird für die Serum- und Konjugat-Inkubation, sowie für die Waschschrte benötigt. Ein Teil des Waschpuffer-Konzentrats wird mit vier Teilen deionisiertem Wasser verdünnt (Verdünnung 1:5).

b) Herstellung der IgG-Konjugatlösung

Ein Teil des IgG-Konjugat-Konzentrats wird mit 1000 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer verdünnt (1+1000).

5.2.2 Testdurchführung

1. Vor Gebrauch sollen alle Reagenzien etwa 30 Minuten auf Raumtemperatur (18C⁰–25C⁰) gebracht werden. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Reagenzien und Kontrollseren in den kleinen Reaktionsgefäßen kurz abzentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden der Gefäße zu sammeln.

2. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt. In die Vertiefungen werden je 2 ml des gebrauchsfertigen Wasch-/Verdünnungspuffers pipetiert. In die mit Waschpuffer gefüllten Vertiefungen wird

vorsichtig je ein Teststreifen mit Hilfe einer Plastikpinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

3. Probenzugabe

Alle Proben werden vor Zugabe gut durchgemischt und kurz abzentrifugiert.

IgG-Testdurchführung: 33 µl einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) oder der entsprechenden Schwachpositiv-Kontrolle werden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipetiert (Verdünnung 1:60)

Die entsprechende Schwachpositiv-Kontrolle IgG soll bei jedem Durchgang unabhängig von der Anzahl der zu testenden Seren mitgeführt werden.

Probennummern und zu detektierende Immunglobulinklasse im Auswertebogen notieren.

4. Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationstemperatur soll zwischen 18 C° und 25 C° liegen.

Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.

2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt, vorzugsweise mit einer Absaugvorrichtung mit angeschlossener Desinfektionsfalle.

3. In jede Vertiefung werden anschließend 2 ml des gebrauchsfertigen Waschpuffers gegeben und für 5 Minuten unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer abgesaugt.

4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt viermal durchgeführt.

Zweite Inkubation

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung 2 ml der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (Anti-human-IgG mit Meerrettichperoxidase gekoppelt) gegeben und 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

Waschen

Die Konjugatlösung wird aus den Vertiefungen abgesaugt und die Streifen werden erneut gewaschen.

Dritte Inkubation

1. In jede Vertiefung werden 2 ml Substratlösung gegeben und 5-15 Minuten unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert.

Dabei wird der Färbungsprozeß beobachtet und alle Streifen so lange in der Flüssigkeit belassen, bis bei den mit der Schwachpositiv-Kontrolle inkubierten Streifen die oberste Bande der Tripelbande (O2-C) zu erkennen war.

2. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen.

3. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für 2 Stunden zwischen saugfähiges Papier gelegt. Anschließend werden die Streifen auf dem im Kit beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Alle Reagenzien werden auf Raumtemperatur gebracht.

2. 2 ml des gebrauchsfertigen Waschpuffers werden vorsichtig in jede Vertiefung pipetiert und vorsichtig mit einer Plastikpinzette je einen Teststreifen hineingelegt.

3. 33 µl der unverdünnten Proben oder der entsprechenden Schwachpositiv-Kontrolle werden in vorgesehenen Vertiefungen pipetiert.

4. Die Inkubationsschale wird abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18 C°-25 C°) unter leichtem Schütteln inkubiert.

5. Der Deckel wird vorsichtig abgenommen und die Flüssigkeit aus den Vertiefungen abgesaugt.

6. Es wird viermal auf dem Schüttler gewaschen.

7. 2 ml der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung wird in jede Vertiefung pipetiert und 1 Stunde unter leichtem Schütteln abgedeckt inkubiert.

8. Es wird viermal auf dem Schüttler gewaschen.
9. 2 ml Substratlösung wird in jede Vertiefung pipetiert und 5-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.
10. Die Streifen werden dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen.
11. Die Streifen werden 2 Stunden zwischen saugfähigem Papier getrocknet und das Ergebnis abgelesen.

5.2.3 Auswertung

Bewertung der Bandenintensität

1. Im beigelegten Auswertebogen werden Datum, Chargen-, und Röhren-Nummer, sowie die detektierte Antikörper-Subklasse notiert.
2. Die Proben-Identifizierungs-Nummern werden in das Protokollblatt eingetragen.
3. Die dazugehörigen Teststreifen werden in die entsprechenden Felder des Auswertebogens eingeklebt und dabei die Reaktions-Kontrollbande an der eingezeichneten Markierungslinie ausgerichtet.
4. Der vorentwickelte Kontrollstreifen mit den markierten Antigenbanden wird so an die aufgeklebten Teststreifen gelegt, daß die Inkubations-Kontroll-Banden in einer Linie ausgerichtet sind. Danach werden die Banden der Teststreifen, welche mit den Untersuchungsproben inkubiert werden identifiziert, deren Intensität bewertet und in den Auswertebogen eingetragen. Der vorentwickelte Kontrollstreifen ist kitspezifisch und stammt aus demselben Nitrozellulose-Block wie die Teststreifen im Testkit. Die Molekulargewichte bzw. die Bezeichnungen der Antigenbanden sind markiert.

Die Bewertung der Intensität der aufgetretenen Banden wird anhand der im Testkit beigelegten Tabelle ausgewertet.

Tabelle 5.2.3.1: Bandenintensität - Auswertung

Reaktion	Intensität
Keine Reaktion	-
Sehr schwache Reaktion	+/-
Schwache Reaktion	+
Gut sichtbare und starke Reaktion	++
Sehr starke Reaktion	+++

Testergebnisse

Als positiv wird eine Probe bezeichnet, wenn im Teststreifen 2 oder mehr Banden aufgetreten sind, deren Intensität mindestens die Bewertung „schwache Reaktion“ erhalten.

Abbildung 5.2.3.2 zeigt einen Teststreifen von Serumproben die für diese Arbeit bearbeitet sind. Es werden Teststreifen mit verschiedener Intensität beobachtet.

Abbild. 5.2.3.2: Teststreifen von bearbeiteten Serumproben dieser Arbeit

recomBlot HEV Art. Nr. 5002 Art. No.		Nr. No.	Erkannte Banden Antigen bands			
			O2N	O2C	O2M	O3
IgG						
		1	-	+	-	-
		2	-	+	-	-
		3	+	+	+	-
		4	+	+	-	-
		5	+	+	-	-
		6	+	+	-	-
		7	+	+	-	-
		8	+	+	-	-
		9	+	+	-	-

6. ERGEBNISSE

6.1 Vergleich der Gruppen

6.1.1 Anti-HEV Prävalenz unter den Blutspendern, dem Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern

Hier interessierte die Frage nach einer möglicherweise erhöhten HEV-Exposition des Schlachthauspersonals und Schweinezüchtern in Nordgriechenland. Die Blutspendergruppe diente als ein Maß für die Häufigkeit von Anti-HEV in der gesunden Wohnbevölkerung dieser Region Griechenlands. Mit dieser Gruppe wurde die Anti-Prävalenz der beruflich gegenüber exponierten Schlachter und Schweinezüchter verglichen.

Tabelle 6.1.1.1: Häufigkeit Anti-HEV-IgG-positive Western Blots bei 108 Blutspendern, 72 Personen des Schlachthauspersonals und 15 Schweinezüchtern

	Blutspender	Schlachthauspersonal	Schweinezüchter
Positive Western Blots/ Zahl der Untersuchten	17 / 108	16 / 72	6 / 15
Prozentueller Anteil	15,7 %	22,2 %	40 %

Wie aus Tabelle 6.1.1.1 ersichtlich ist, waren unter den 108 untersuchten Blutspender 17 positiv auf Anti-HEV, was einen prozentuellen Anteil von 15,7% entspricht. Unter den 72 untersuchten Schlachter waren 16, also 22,2%, positiv auf Anti-HEV, ausmacht und von den 15 Schweinezüchtern waren 6, also 40%, positiv auf Anti-HEV. Das Schlachthauspersonal weist somit etwas häufiger Antikörper gegen HEV auf als Blutspender. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p: 0,3265$). Die Schweinezüchter weisen häufiger Antikörper gegen HEV als die Blutspender auf. Dieser Unterschied ist signifikant ($p: 0,0352$).

6.1.2 Häufigkeit der einzelnen ORF Banden bei Western-Blot-positiven Blutspendern, Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

Bei positivem Western Blot wurde geprüft, ob die Häufigkeit der verschiedenen Banden in den 3 Gruppen unterschiedlich ist (siehe Tabelle 6.1.2.1 und Abbildung 6.1.2.2).

Mit den 17 positiven Seren der Blutspendergruppe traten im Western Blot insgesamt 36 Banden auf. 7mal mit dem O2N-Peptid, gleich 41%, 13mal mit dem O2C-Peptid, gleich 77%, 14mal mit dem O2M-Peptid, gleich 82% und 2mal mit dem O3-Peptid, gleich 11,7%.

In den 16 positiven Seren des Schlachthauspersonals wurde 34mal eine ORF-Banden-Reaktion gefunden: jeweils 10mal mit dem O2N-Peptid und dem O2C-Peptid, gleich 63%, 13mal mit dem O2M-Peptid, gleich 81%, und 1mal mit dem O3-Peptid, gleich 6%.

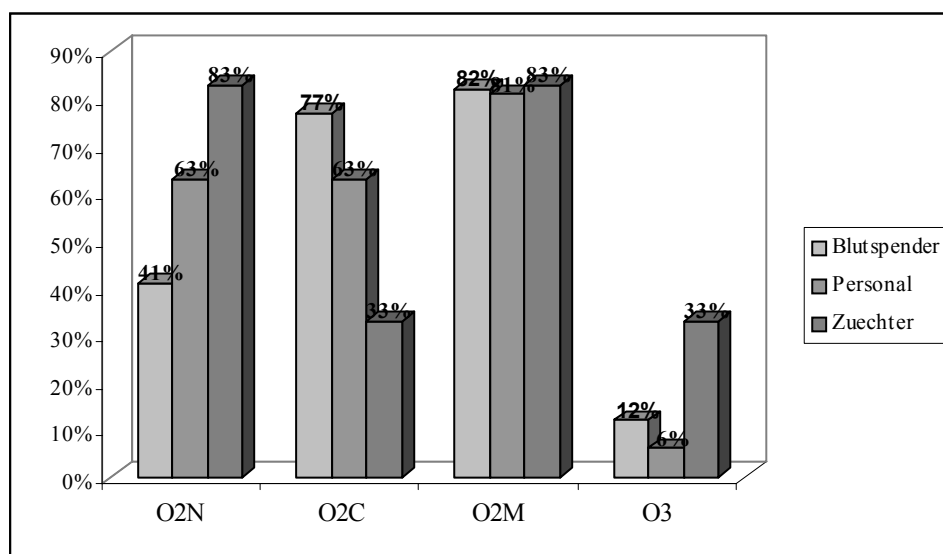
Die 6 positiven Seren der Schweinezüchter zeigten insgesamt 14 Banden: jeweils 5mal mit dem O2N-Peptid und dem O2M-Peptid, gleich 83%, und je 2mal mit dem O2C-Peptid und dem O3-Peptid, gleich 33%.

Antikörper gegen das O2N-Peptid scheinen bei Schweinezüchtern häufiger und Antikörper gegen O2C-Peptid seltener zu sein als bei Anti-HEV-positiven Blutspendern. Diese Unterschiede erreichen jedoch nicht Signifikanzniveau ($p: 0,1550$ für O2N-Peptid und $p: 0,1310$ für O2C-Peptid).

Tabelle 6.1.2.1: Häufigkeit der einzelnen ORF Banden der bei Anti-HEV Western Blots von Blutspendern, Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

HEV-Peptide	O2N	O2C	O2M	O3	Peptide-Gesamtzahl
Blutspender (n = 17)	7 / 17 (41 %)	13 / 17 (77 %)	14 / 17 (82 %)	2 / 17 (12 %)	36 / 17
Schlachthaus- personal (n=16)	10 / 16 (63 %)	10 / 16 (63 %)	13 / 16 (81 %)	1 / 16 (6 %)	34 / 16
Schweine- züchter (n = 6)	5 / 6 (83 %)	2 / 6 (33 %)	2 / 6 (83 %)	2 / 6 (33 %)	14 / 6

Abbildung 6.1.2.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit der einzelnen ORF Banden bei Blutspendern (BS), Schlachthauspersonal (SP) und Schweinezüchtern (SZ) mit Anti-HEV-positiven Western Blot.



6.2 Prävalenz Anti-HEV in den Schweinen und Vergleich zur Prävalenz in Gruppen der Wohnbevölkerung

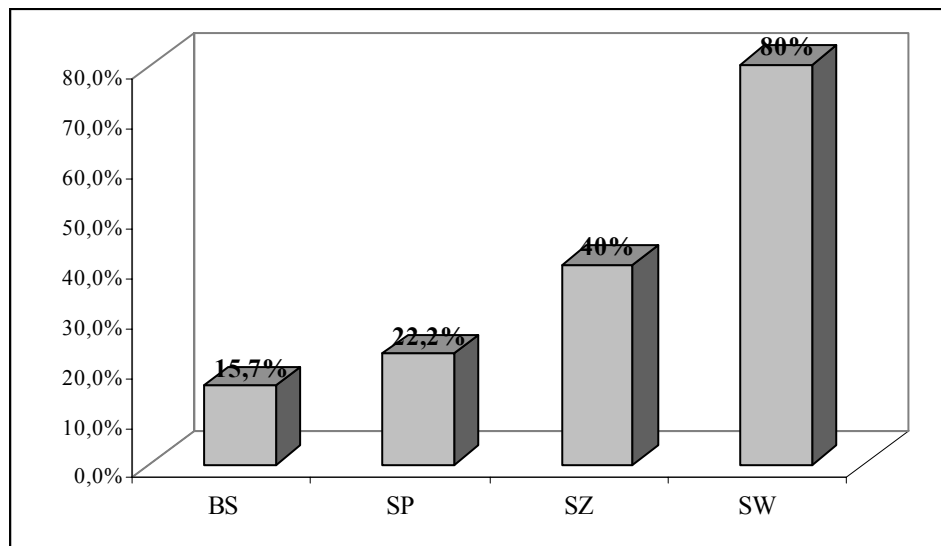
6.2.1 Anti-HEV Prävalenz bei den untersuchten Schweineseren

Wie aus Tabelle 6.2.1.1 und Abbildung 6.2.1.2 ersichtlich wird, wurde in 76 der untersuchten 95 Blutproben der zur Schlachtung herangeführten Schweinen mit einem Alter von 5 bis 6 Monaten Anti-HEV festgestellt, was eine Prävalenz von 80% entspricht (siehe Tabelle 6.2.1.1 und Abbildung 6.2.1.2).

Tabelle 6.2.1.1: Ergebnis der Western Blot-Untersuchung auf Anti-HEV bei Blutspendern, Schlachthaus personal, Schweinezüchtern und Schweinen

	Blutspender	Schlachthaus- personal	Schweine- züchter	Schweine
Zahl positiv / Gesamtzahl	17 / 108	16 / 72	6 / 15	76 / 95
Prozentueller Anteil	15,7%	22,2%	40%	80%

Abbildung 6.2.1.2: Grafische Darstellung der Häufigkeit positiver Western Blots bei Blutspendern (BS), Schlachthauspersonal (SP), Schweinezüchtern (SZ) und Schweinen (SW)



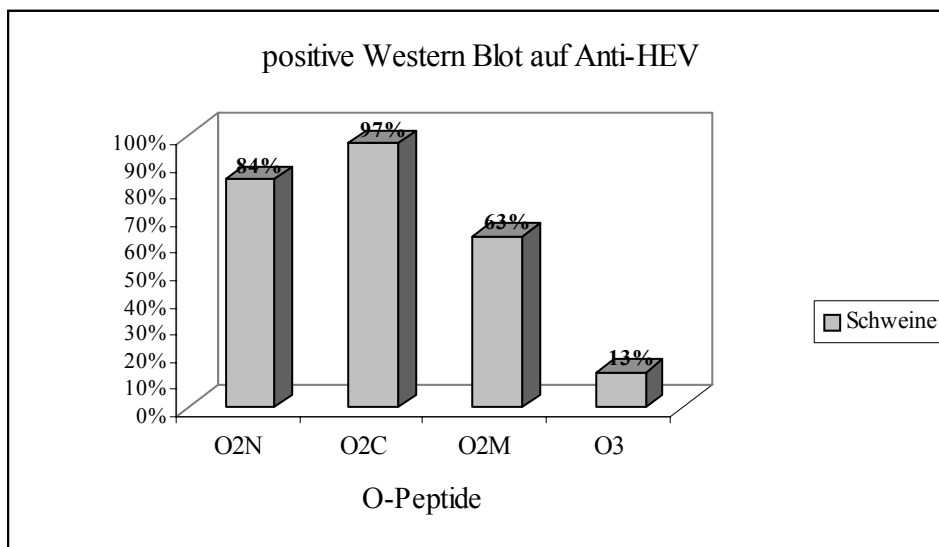
6.2.2: Häufigkeit des Nachweises einzelner Banden bei Schweinen mit positivem Western Blot

Bei den 76 positiven Western Blots mit Schweineseren wurden insgesamt 196 eine Banden gefunden. Es wurden 64mal das O2N-Peptid, gleich 84%, 74mal das O2C-Peptid, gleich 97%, 48mal das O2M-Peptid, gleich 63% und 10mal das O3-Peptid, gleich 13%, gesehen (siehe Tabelle 6.2.2.1 und Abbildung 6.2.2.2).

Tabelle 6.2.2.1: Häufigkeit des Nachweises einzelner Banden bei 76 Schweinen mit positivem Western Blot auf Anti-HEV

HEV-Peptide	O2N	O2C	O2M	O3	Peptide-gesamtzahl
Zahl positiv / Gesamtzahl	64 / 76	74 / 76	48 / 76	10 / 76	196 / 76
Prozentueller Anteil	84 %	97 %	63 %	13 %	

Abbildung 6.2.2.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit des Nachweises einzelner Banden bei 76 Schweinen (SW) mit positivem Western Blot auf Anti-HEV



6. 3 Altersverteilung

6.3.1 Altersverteilung Anti-HEV-positiver Befunde beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern

Um zu prüfen, ob eine Beziehung zwischen Lebensalter und einem Anti-HEV-positiven Befund besteht, wurde das Schlachthauspersonal und die Schweinezüchter nach ihrem Lebensalter in zwei Gruppen eingeteilt worden. Wie aus der Tabelle 6.3.1.1 zu entnehmen ist, sind unter der Gesamtzahl der 72 Personen des Schlachthauspersonals 33 bis 35 Jahre alt, was einem prozentuellen Anteil von 46% entspricht und 39, gleich 54%, über 35 Jahre alt. 5 der 15 Schweinezüchtern sind bis 35 Jahre alt, das ist gleich 33%, und 10, gleich 67%, über 35 Jahre alt.

Tabelle 6.3.1.1: Altersverteilung beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern

Lebensjahre	Schlachthaus- personal (n = 72)	Schweine- züchter (n = 15)
bis 35 J.	33 / 72 (46 %)	5 / 15 (33 %)
älter als 35 J.	39 / 72 (54 %)	10 / 15 (67 %)

Unter der Gesamtzahl der 72 im Schlachthaus beschäftigten Personen waren 16 positiv auf Anti-HEV. Darunter sind 6 bis 35 Jahre alt, das ist gleich 38% und 10 Personen, gleich 63% älter als 35 Jahre (siehe Tabelle 6.3.2.1). Unter den 6 positiv auf Anti-HEV Schweinezüchtern ist nur 1 bis 35 Jahre alt, das ist gleich 17% und 5, gleich 83%, sind über 35 Jahre alt.

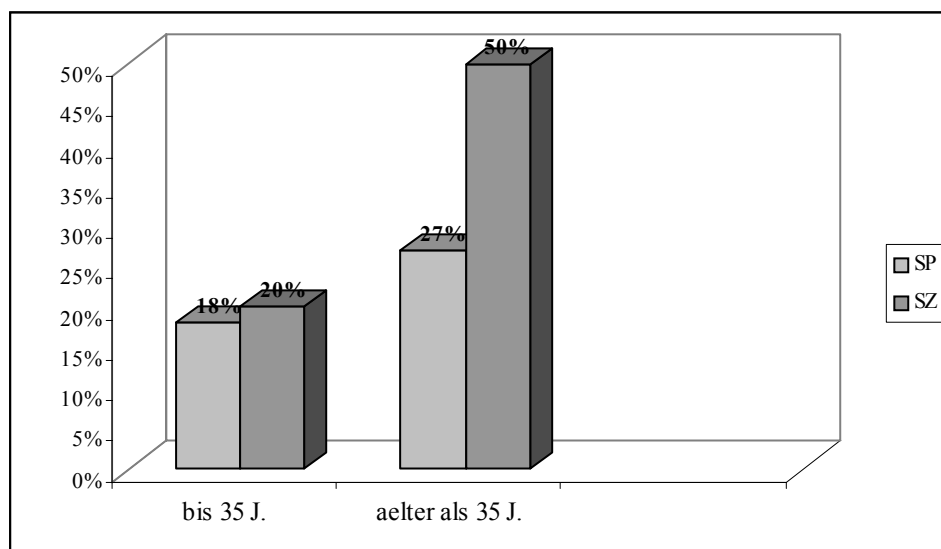
Bei Schweinezüchtern sind im Alter über 35 Jahren mehr Personen Anti-HEV als bei Züchtern bis 35 Jahre (50% versus 20%). Der Unterschied ist nicht signifikant (p: 0,5804).

Bei Schlachthauspersonal sind im Alter über 35 Jahren etwas häufiger Personen Anti-HEV als beim Personal bis 35 Jahre (54% - 46%). Der Unterschied ist nicht signifikant ($p: 0,5725$).

Tabelle 6.3.2.1: Häufigkeit positiver Western Blots in zwei Altersgruppen von Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

Lebensjahre	Schlachthauspersonal (n = 72)	Schweinezüchter (n = 15)
bis 35 J.	6 / 33 (18 %)	1 / 5 (20 %)
älter als 35 J.	10 / 39 (27 %)	5 / 10 (50 %)

Abbildung 6.3.1: Grafische Darstellung der Häufigkeit positiver Western Blots in zwei Altersgruppen von Schlachthauspersonal (SP) und den Schweinezüchtern (SZ)



6.4 Berufsjahreverteilung

6.4.1 Berufsjahreverteilung bei Anti-HEV positivem Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

Um zu prüfen, ob eine Beziehung zwischen Dauer der Berufstätigkeit und einem Anti-HEV-positiven Befund besteht wurden das Schlachthauspersonal und die Schweinezüchter aufgrund der Berufsjahren in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe umfaßte Personen die bis 10 Jahre und die andere Gruppe Personen die länger als 10 Jahren den entsprechenden Beruf ausgeübt hatten. Unter den 72 Personen des Schlachthauspersonals sind 31, d.h. 43% bis 10 Jahren im Beruf, 41 Personen, das ist gleich 57%, sind mehr als 10 Jahre tätig. Von 15 Schweinezüchtern sind 9 (60%) bis 10 Jahre und 6 (40%) über 10 Jahre tätig (siehe Tabelle 6.4.1.1)

Tabelle 6.4.1.1: Dauer der Berufstätigkeit von Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

Berufsjahre	Schlachthauspersonal	Schweinezüchter
bis 10 J.	31 / 72 (43 %)	9 / 15 (60 %)
mehr als 10 J.	41 / 72 (57 %)	6 / 15 (40 %)

Unter den 16 Personen des Schlachthauspersonals, die eine Anti-HEV-Positivität im Western Blot aufwies, sind 5, das entspricht 31%, die bis zu 10 Jahren diesen Beruf ausgeübt haben und 11, gleich 69%, die mehr als 10 Jahren im Beruf sind. 4 von insgesamt 6 Anti-HEV-positiven Schweinezüchtern, das entspricht einen prozentuellen Anteil von 67% üben diesen Beruf nicht länger als 10 Jahren und 2, gleich 33%, züchteten Schweine mehr als 10 Jahren (siehe Tabelle 6.4.2.1).

Tabelle 6.4.2.1: Berufsjahreverteilung bei Anti-HEV-positivem Western Blot beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern

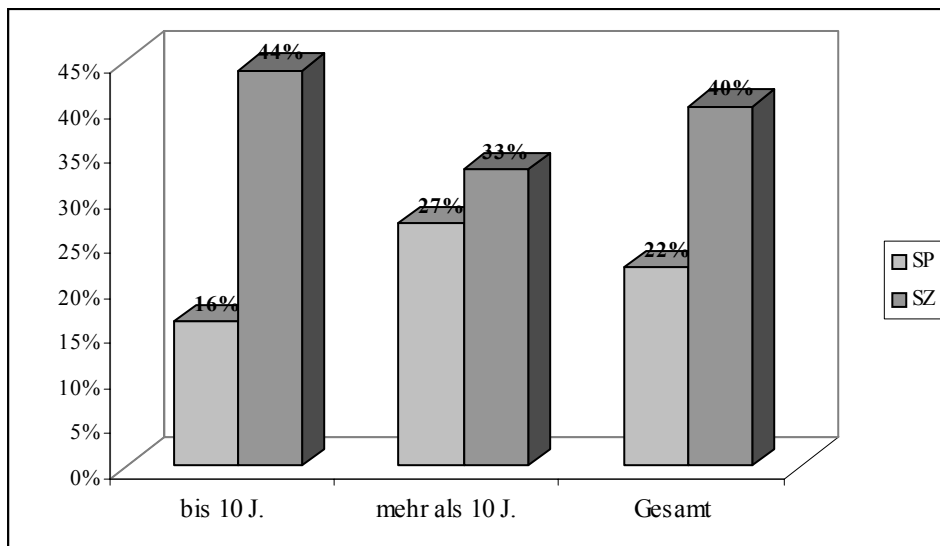
Berufsjahre	Schlachthauspersonal	Schweinezüchter
bis 10 J.	5 / 16 (31 %)	4 / 6 (67 %)
mehr als 10 J.	11 / 16 (69 %)	2 / 6 (33 %)

Bei Schlachthauspersonal wurde ein nicht signifikanter ($p:0,3925$) Anstieg der Anti-HEV-Prävalenz mit der Dauer der Berufstätigkeit registriert. Die Zahl der untersuchten Schweinezüchter ist zu gering, um einen solchen Trend erkennen zu können. Da mit der Dauer der Berufstätigkeit auch das Lebensalter ansteigt, könnte es sich aber beim Anstieg der Anti-HEV-Prävalenz des Schlachthauspersonals auch um eine individuelle Beziehung handeln. Eine berufliche HEV-Gefährdung läßt sich deshalb mit diesen Daten nicht nachweisen (siehe Tabelle 6.4.2.2 und Abbildung 6.4.2.3).

Tabelle 6.4.2.2: Häufigkeit von Anti-HEV bei Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern in Abhängigkeit zur Dauer der Berufstätigkeit

Berufsjahre	Schlachthauspersonal	Schweinezüchter
bis 10 Jahre	5 / 31 (16 %)	4 / 9 (44 %)
mehr als 10 Jahre	11 / 41 (27 %)	2 / 6 (33 %)
Gesamt	16 / 72 (22 %)	6 / 15 (40 %)

Abbildung 6.4.2.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit von Anti-HEV bei Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern in Abhängigkeit zur Dauer der Berufstätigkeit



6.5 Häufigkeit von Antikörpern gegen die rekombinant hergestellten HEV-Teilproteine im Western Blot

Die Seren sind mittels der Western Blot Methode auf das Vorhandensein von Anti-HEV untersucht worden. Als Antigene sind vier rekombinant hergestellte HEV-Teilproteine O2N, O2C, O2M und O3 verwendet worden, die von der Gensequenz eines in Madras isolierten Hepatitis E Virus abgeleitet sind.

Die Antigene wurden in E.coli exprimiert und anschließend hoch gereinigt. Ein Nachweis von Anti-HEV gilt dann als gesichert, wenn im Anti-HEV-IgG-Western-Blot mindestens zwei Banden nachweisbar sind. Nach einer früher abgelaufenen Infektion werden beim Menschen Antikörper der IgG-Klasse meist gegen das ORF2

C-terminale Peptid, gefolgt von dem ORF2 N-terminalen Peptid, gefunden. Antikörper gegen das ORF3-Peptid sind meist mit akuten Infektion assoziiert.

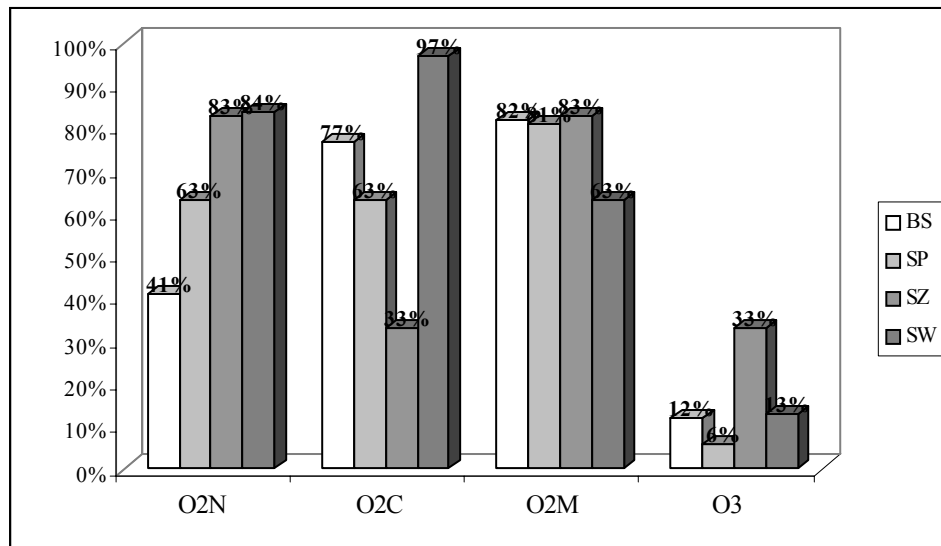
Unter den 108 Blutspenderseren waren 17 (15,7%), von 72 der in Schlachthöfen tätigen Personen waren 16 (22,2%) und von 15 Schweinezüchtern waren 6 (40%) positiv auf Anti-HEV. 80% (76 von 95) der im Alter von 5 bis 6 Monaten untersuchten Schweine waren positiv auf Anti-HEV.

Die Häufigkeit von Antikörpern gegen die HEV-Teilproteine O2N, O2C, O2M und O3 in den positiven Western Blot positiven Seren der drei untersuchten Personengruppen und den Schweinen war folgende (siehe Tabelle 6.4.2.1 und Abbildung 6.4.2.2).

Tabelle: 6.4.2.1: Häufigkeit von Antikörpern gegen die HEV-Teilproteine O2N, O2C, O2M und O3 in Anti-HEV-positiven Seren von Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schweinen

Anti-HEV-positive Seren	O2N	O2C	O2M	O3
Blutspender (n=17)	7 (41 %)	13 (77 %)	14 (82 %)	2 (12 %)
Schlachthauspersonal (n=16)	10 (63 %)	10 (63 %)	13 (81 %)	1 (6 %)
Schweinezüchter (n=6)	5 (83 %)	2 (33 %)	5 (83 %)	2 (33 %)
Schweine (n=76)	64 (84 %)	74 (97 %)	48 (63 %)	10 (13 %)

Abbildung 6.4.2.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit einzelner Banden bei Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schweinen mit positivem Western Blot auf Anti-HEV



In den 17 positiven Blutspenderseren sind 7mal (41%) Antikörper gegen das O2N, 13mal (77%) gegen das O2C 14mal (82%) gegen das O2M und 2mal (12%) gegen das O3 ermittelt worden.

Die 16 positiven Schlachthauspersonalseren zeigten ein Auftreten von Antikörpern gegen O2N und O2C in jeweils 10 Seren (63%), von O2M in 13 Seren (81%) und von O3 in einem Serum (6%).

In den 6 positiven Schweinezüchterseren waren Antikörper gegen das O2N und das O2M je 5mal (83%) und gegen das O2C und das O3 jeweils 2mal (33%) festzustellen.

Unter den 76 positiven Schweineseren wurde Antikörper gegen das O2N 64mal (84%), gegen das O2C 74mal (97%), gegen das O2M 48mal (63%) und gegen das O3 10mal (13%) gefunden.

Beim Vergleich der Häufigkeit des Auftretens von Antikörpern gegen einzelne ORF-Peptide ist auffallend, daß das O2M-Peptid in alle drei Personengruppen mit etwa 82% am häufigsten vorhanden war. Antikörper gegen das O2N- und O2C-Peptid traten in unterschiedlicher Häufigkeit bei den drei Personengruppen auf, die von 33% bis zu 83% reichte. Der geringe Prozentsatz der Schweinezüchter mit Antikörpern

gegen O2C ist allerdings bei der geringen Zahl der positiven Seren (n=6) kaum aussagekräftig. Das O3-Peptid, das ein Zeichen von akuter Hepatitis E Infektion ist, trat mit einer Häufigkeit von 6% bis 33% am seltensten auf, was auf eine begrenzte Zahl von frischen HEV-Infektionen hindeutet.

Fast alle positive Schweineseren, 97%, zeigten ein Auftreten von Antikörpern gegen das O2C-Peptid, gefolgt von O2N, mit 84%, dem O2M, mit 63% und dem O3, mit 13%.

Somit könnten Antikörper gegen die verschiedenen HEV-Proteine bei Anti-HEV positiven Menschen und Schweinen in ähnlicher Häufigkeit nachgewiesen werden. Die Immunreaktion des Schweins gegen HEV richtet sich somit gegen ähnliche Epitope wie die Immunreaktion des Menschen. Die etwas höhere Häufigkeit von Antikörpern gegen O2N und O2C beim Schwein könnte dadurch bedingt sein, daß die HEV-Infektion bei den untersuchten Schlachtschweinen noch nicht lange zurück liegt wie bei den untersuchten Menschen.

6.6 Zur statischen Auswertung

Zu statistischer Absicherung der Prävalenzunterschiede von Anti-HEV wurde der exakte Fisher-Test herangezogen. Ein Unterschied wurde im zweiseitigen Test als signifikant angesehen, wenn p kleiner oder gleich 0,05 war.

Der Vergleich zwischen Schlachthauspersonal und Blutspendern zeigt einen nicht signifikanten Trend der Zunahme der Häufigkeit von Anti-HEV (p: 0,3265 und Relatives Risiko des Antikörpernachweises 1,273)

Beim Vergleich der Häufigkeit positiver Western Blots zwischen Schweinezüchtern und Blutspendern, zeigt sich, daß Schweinezüchter signifikant häufiger Anti-HEV haben als die Blutspender. (p: 0,0352 und Relatives Risiko: 2,899).

Beim Vergleich der Häufigkeit Anti-HEV positiven Western Blots bei Schweinen, Blutspendern, Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern ergibt sich, daß Schweine signifikant häufiger Anti-HEV positiv sind als die drei untersuchten Personengruppen (p: <0.0001 und Relatives Risiko: 4,731 beim Vergleich

Schweinen/Blutspendern; $p: <0,0001$ und Relatives Risiko: 3.261 beim Vergleich Schweinen/Schlachthauspersonal; $p: 0,0024$ und Relatives Risiko: 1,366 beim Vergleich Schweinen/Schweinezüchtern).

Bei der Betrachtung der Dauer der Berufsausübung und des Alters der untersuchten Schweinezüchter und des Schlachthauspersonals konnte festgestellt werden:

- beim Schlachthauspersonal ist ein nicht signifikanter Trend der Zunahme der Häufigkeit des Anti-HEV mit dem Alter ($p: 0,5725$ und Relatives Risiko: 1,207) und der Dauer der Berufstätigkeit ($p: 0,3925$ und Relatives Risiko: 1,283) vorhanden.
- bei den Schweinezüchtern ist ein nicht signifikanter Trend der Zunahme der Häufigkeit von Anti-HEV mit dem Alter ($p: 0,5804$ und Relatives Risiko: 1,500) aber keine Abhängigkeit von der Dauer der Berufsausübung vorhanden.
- bei den Anti-HEV-positiven Personen der drei untersuchten Gruppen unterscheidet sich die Häufigkeit der Antikörper gegen die verschiedenen HEV-Peptiden nicht signifikant.
- bei den Anti-HEV positiven Schweinen werden Antikörper gegen das O2N-Peptid signifikant häufiger gefunden als bei positiven Blutspendern ($p: 0,0006$ und Relatives Risiko: 1,653); Ebenso gegen das O2C-Peptid ($p: 0,0095$ und Relatives Risiko: 2,552). Gegen das O2M-Peptid werden Antikörper nicht signifikant ($p: 0,1620$ und Relatives Risiko: 0,8571) seltener gefunden als bei positiven Blutspendern und ebenso gegen O3 nicht signifikant seltener ($p: 1,0000$ und Relatives Risiko: 1,023)

7. DISKUSSION

In den Industrieländern sind HEV-Erkrankungen selten. Die meisten der berichteten Fällen betreffen Personen mit einer Reiseanamnese in ein für Hepatitis E hochendemisches Gebiet. Obgleich die Fälle von HEV-Erkrankungen in den wenig endemischen Ländern selten sind, können bei Prävalenzuntersuchungen relativ häufig Antikörper in der gesunden Bevölkerung nachgewiesen werden. Studien zeigten Prävalenzraten von 1 bis 3% unter den Blutspender unter anderem in den USA, in Griechenland, Deutschland, Italien, Spanien, Niederlande, Kanada und England. Mit Verbesserung der Testmethoden wurden in den letzten Jahren noch höhere Prävalenzraten gesehen. Eine Anti-HEV-Antikörper Prävalenz von etwa 21% Blutspendern ist in Baltimore ermittelt worden. Auch in Japan wurde Anti-HEV bei 1,9 bis 14,1% der gesunden Bevölkerung festgestellt. Vor kurzem ist in den USA erneut eine Anti-HEV-Rate von 18 % ermittelt worden. (THOMAS et al. 1997, KARENTYI et al. 1999, MAST et al. 1997, MENG et al. 2002, PSYCHOGIOU et al. 1996, KNODLER et al. 1994, FROESSNER et al. 1999, NUBLING et al. 2002, ZANETTI et al. 1994, PAVIA et al. 1998, MATEOS et al. 1998, TARRAGO et al. 2000, ZAAIJER et al. 1995, YOO et al. 2000, BERNAL et al. 1996).

Die Diskrepanz zwischen der Prävalenz von Anti-HEV und den Erkrankungsbilder einer HEV-Infektion mit klinischer Symptomatik in den Industrieländern, ist seit langer Zeit ein Rätsel.

In dieser Arbeit wurden Blutspenderseren aus dem Raum Nordgriechenlands mittels der Western Blot Untersuchungsmethode auf das Vorhandensein von Anti-HEV untersucht. 15,7% der hier untersuchten Blutspender waren positiv. Diese Prävalenzrate stimmt mit den Ergebnissen der oben erwähnten Studien der letzten Jahren überein, so daß gesagt werden kann, daß auch in Griechenland eine hohe Anti-HEV Prävalenz festzustellen ist.

Zieht man zum Vergleich die Ergebnisse einer Untersuchung über die Anti-HEV Prävalenz in Griechenland aus dem Jahre 1996 heran, so ist jedoch ein großer Unterschied festzustellen. Damals war eine Anti-HEV Prävalenzrate von 2,2% (PSYCHOGIOU et al. 1996) in der gesunden griechischen Bevölkerung festgestellt

worden. Gründe für diese große Differenz zwischen den zwei Untersuchungen könnten sein:

- α) Die Nachweisempfindlichkeit der Untersuchungsmethode: In der Arbeit von 1994 wurden die Seren mittels der wenig empfindlichen ELISA-Methode auf das Vorhandensein von Anti-HEV Antikörper untersucht, und in der vorliegenden Arbeit wurde der hochempfindliche Western Blot eingesetzt.

- β) In den letzten Jahren kam eine große Zahl von Einwanderer aus Regionen der ehemaligen Sowjet Union und aus Albanien nach Griechenland. Wenn in Erwägung gezogen wird, daß viele Regionen der ehemaligen Sowjet Union als Hochendemiegebiete für HEV gelten, so könnte diese Tatsache unter anderem zur einer Erhöhung der Anti-HEV Rate beigetragen haben.

- γ) Die Tendenz zur höheren Anti-HEV Prävalenzrate, die in den letzten Jahren in vielen nicht-endemischen Gebieten gesehen wurde, ist nun auch in Griechenland feststellbar.

In letzten Jahren wurde eine zunehmende Anzahl von akuten sporadischen Hepatitis E Erkrankungen in Industrieländern, wie den USA (KWO et al. 1997, THOMAS et al. 1997, SCHLAUDER et al 1998, ERKER et al. 1999), Japan (TAHASKI et al. 2002), Österreich (WORM et al. 1998), Frankreich (BOHME et al. 1998), Griechenland (SCHLAUDER et al. 1999) und Italien (ZANETTI et al. 1994) registriert. Ein Teil dieser Patienten hatte keine Reiseanamnese in ein für HEV endemisches Gebiet. So wurde vermutet, daß die HEV Infektion inländisch erworben worden ist.

Das Auftreten von Hepatitis E Erkrankungen ohne Reiseanamnese und die überraschend hohe Anti-HEV Prävalenz in bisher als nicht endemisch angesehenen Industrieländern, hat zu der Hypothese geführt, daß Tiere als Reservoir für das HEV dienen könnten. Neuere Untersuchungen unterstützen die Hypothese einer zoonotischen Infektion. Anti-HEV Antikörper wurden in vielen Tierarten weltweit nachgewiesen und dies, sowohl in für HEV hochendemischen Gebieten als auch in wenig endemischen. In Vietnam, ein für HEV endemisches Gebiet sind Anti-HEV Antikörper in 44% der Hühnern, in 36% den Schweinen, in 27% der Hunden und in 9% der Ratten gefunden worden (TIEN et al. 1997). Vor kurzem ist das Vorhandensein von Anti-HEV in 29 bis 62% der Kühen in drei HEV endemische Ländern (Somalien, Tadjikistan und Turkmenistan) und in 12% der Kühen in der Ukraine, ein wenig endemischen Gebiet, festgestellt worden (FAVOROV et al.

1998). Auch 42 bis 67% der Schafe und Ziegen waren in Turkmenistan positiv fuer Anti-HEV. In Indien ist Anti-HEV in 4,4% bis 6,9% der Katzen und 2,1 bis 21,5% der Nagetiere gezeigt worden (ARANKALLE et al. 2001). Wilde Ratten in den USA und anderen Ländern zeigten ebenfalls eine Anti-HEV Positivität (KARENTNYI et al. 1993, MANEERAT, et al. 1996, TSAREV et al 1998, KABRANE-LAZIZI et al. 1999, FAVOROV et al. 2000, ARANKALLE et al. 2001). Auch bei wild abgefangenen Rhesusaffen ist Anti-HEV festgestellt worden (TSAREV et al. 1995).

Bereits 1990 demonstrierte BALAYAN, daß Schweine mit menschlichen HEV-Isolaten infiziert werden können (BALAYAN et al. 1990). In Nepal, ein HEV-Hochendemiegebiet, ist bei etwa 33% der inländischen Schweinen Anti-HEV gefunden worden (CLAYSON et al. 1995). Weiter ist in den USA Anti-HEV in mehr als 80% der Schweine, die älter als 3 Monaten waren, festgestellt worden, und auch in 76,4% der Schweine in Deutschland ist Anti-HEV vorhanden (MENG et al. 1997, FROESNER et al. 1998). Nach der Entdeckung und Isolierung eines HEV Isolates vom Schwein, des SwHEV-Isolates, im Jahre 1997 in den USA wurden Studien in zahlreichen Ländern durchgeführt, um das Vorhandensein von Anti-HEV Antikörpern in den Schweinen zu überprüfen. Es wurde ermittelt, daß bei Schweinen sowohl in für HEV hochendemischen als auch in wenig endemischen Ländern positiv auf Anti-HEV waren: In 92 bis 95% in Australien, bis in 91% der Schweineherde in Neuseeland, in 37% Taiwan, in 38,3 bis 88,8% Kanada von und zu 54,6 bis 74,4% in Indien (CHANDLER et al. 1999, KRAEMER et al. 1999, GARKAVENKO et al. 2001, HSIEH et al. 1999, YOO et al. 2001, ARANKALLE et al. 2001). Auch in China und in Thailand, also Hochendemiegebieten, ist eine hohe Anti-HEV Prävalenz ermittelt worden (MENG et al. 1999).

Es stellte sich also heraus, daß Schweine in allen untersuchten Ländern, unabhängig von der Häufigkeit von Erkrankungen des Menschen, hohe Seroprävalenz von Anti-HEV zeigten. So wurde vorgeschlagen, daß HEV in den Schweinen enzoonotisch und unabhängig von der Zirkulation des HEV beim Menschen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Schweineseren aus Griechenland auf das Vorhandensein von Anti-HEV untersucht. Die Schweine, von denen die Seren gewonnen wurden, waren zur Schlachtung herangeführt worden, waren alle gesund und hatten ein Alter von 5 bis 6 Monaten. Die Tiere stammten aus Schweinezuchtbetrieben in Nordgriechenland.

Der Prozentsatz Anti-HEV positiven Schweine war überraschend hoch. Von 95 untersuchten Schweineseren waren 76 positiv auf Anti-HEV, was einem prozentuellen Anteil von 80% entspricht. Diese hohe Seroprävalenzrate von Anti-HEV in den Schweinen von Nordgriechenland läßt darauf schließen, daß HEV auch in Nordgriechenland weit unter den Schweinen verbreitet ist.

Da HEV fäkal-oral übertragen wird, erhebt sich die Frage einer Zoonose, also einer Übertragung vom Schwein auf den Menschen. Zusätzlich wird im Rahmen einer Xenotransplantation von Schweinorganen die mögliche Gefahr einer Xenozoonose diskutiert, da Schweineorgane eine alternative Lösung für den Mangel an Organspender darstellen. Schweine sind einfach zu züchten, ihre Organe erreichen eine Größe, die mit den menschlichen Organen vergleichbar ist, und ihre Lebenserwartung ist um die 30 Jahre (YOO et al. 2000).

Die Entdeckung von zwei HEV-Isolaten des Menschen in den USA, die eine Aminosäureidentifikation von 99% mit dem SwHEV-Isolat vom Schwein, aber eine geringe Identität mit anderen Isolaten des Menschen zeigte, unterstützt die Hypothese, daß ein Teil der HEV-Infektionen des Menschen vom Schwein stammt. (SCHLAUDER et al. 1998, MENG et al. 1998). Auch in Taiwan ist ein neues HEV-Isolat bei einem Patienten ohne Reiseanamnese isoliert worden, das einerseits aber eine sich eindeutig von anderen bisher bekannten HEV-Isolaten unterscheidet, andererseits große Ähnlichkeit mit einem in Taiwan vom Schwein isolierten HEV-Isolat besitzt (HSIEH et al. 1998, HSIEH et al. 1999). Weitere Untersuchungen kamen zu ähnlichen Resultaten. Unter anderem ist in Japan, in Kanada und in der Niederlande festgestellt worden, daß die in diesen Länder entdeckten und sequenzierten Mensch- und Schwein-HEV-Isolate in gleichen geographischen Regionen eine große Ähnlichkeit in der Nukleinsäuresequenz zeigen (OKAMOTO et al. 2001, YOO et al. 2001, v. der POEL et al. 2001).

Dies wirft die Frage auf, ob Personen mit engem beruflichem Kontakt zur Schweinen einer höheren Gefahr einer zoonotischen HEV-Infektion ausgesetzt sind. Als Personengruppen mit engem beruflichem Kontakt zu Schweinen gelten Schweinezüchter, Schlachthauspersonal, Tierärzte und Schweinefleischhändler. In Taiwan, ein für HEV wenig endemisches Gebiet, waren unter den untersuchten Schweinefleischhändlern 27% positiv auf Anti-HEV, im Vergleich zu nur 8% der Kontrollgruppe (HSIEH et al. 1999). In einer Untersuchung in China und Thailand, für HEV Hochendemiegebiete, wurde ermittelt, daß in China 11 von 11, gleich 100%,

und in Thailand 5 von 7, gleich 71%, der untersuchten Schweinefleischhändler positiv auf Anti-HEV waren. Die Anti-HEV-Prävalenzrate unter den Blutspender in den zwei Ländern war 55% (MENG et al. 1999). In Moldovien, ein für HEV wenig endemisches Gebiet, zeigte sich eine Anti-HEV Prävalenzrate von 51,1% unter den Schweinezüchtern und von 24,7% unter der normalen Bevölkerung (DROBENIUC et al. 2001). In einer vor kurzem in den USA erschienenen Studie waren 26% der untersuchten Tierärzte, die engen beruflichen Kontakt zu Schweinen hatten, Anti-HEV positiv, im Vergleich zu 18% der Blutspender (MENG et al. 2002).

Auch in der vorliegenden Arbeit ist die Prävalenz von Anti-HEV bei in Nordgriechenland untersuchtem Schlachthauspersonal mit 22,2% und bei Schweinezüchtern mit 40% höher als in der Vergleichsgruppe der Blutspender mit 15,7%.

Die höhere Anti-HEV-Prävalenz der Schweinezüchter im Vergleich zum Schlachthauspersonal sollte nicht überraschen, da HEV-Infektionen hauptsächlich bei jungen Schweinen im Alter von 2 bis 3 Monaten auftreten. Das Vorhandensein von Viren im Blut dauert ungefähr 1 bis 2 Wochen, und auch die Virusausscheidung im Stuhl ist nur kurz. So haben Schweinezüchter ein viel größeres Risiko dem HEV ausgesetzt zu werden als Schlachthauspersonal, da Schweine meist erst im Alter von 5 bis 6 Monaten geschlachtet werden. Hier sollte auch die Tatsache erwähnt werden, daß in Griechenland Schweinezucht meist ein Familienbetrieb ist und dadurch schon im Kindesalter vor Beginn der Berufsausübung eine Exposition bestehen kann.

Auch der hier gezeigte relativ geringe Anteil von 13% von Antikörpern gegen das O3-Protein des HEV bei Anti-HEV-positiven Schlachtschweinen läßt vermuten, daß bei der Mehrzahl dieser Schweine die HEV-Infektion bereits abgelaufen ist und keine HEV-Infektiosität mehr besteht. Antikörper gegen das O3-Protein gelten als Marker für eine frische HEV-Infektion und werden nur selten bei einer abgelaufenen HEV-Infektion gefunden. Diese Daten sprechen ebenfalls dafür, daß die HEV-Exposition von Schweinezüchtern wahrscheinlich höher ist als die von Schlachthauspersonal.

Zu statistischen Absicherung der Prävalenzunterschiede von Anti-HEV wurde der exakte Fisher-Test herangezogen. Ein Unterschied wurde im zweiseitigen Test als signifikant angesehen, wenn p kleiner oder gleich 0,05 war.

Der Vergleich zwischen Schlachthauspersonal und Blutspendern zeigt einen nicht signifikanten Trend der Zunahme der Häufigkeit von Anti-HEV (p : 0,3265 und Relatives Risiko des Antikörpernachweises 1,273)

Beim Vergleich der Häufigkeit positiver Western Blots zwischen Schweinezüchtern und Blutspendern, zeigt sich, daß Schweinezüchter signifikant häufiger Anti-HEV haben als die Blutspender. ($p:0,0352$ und Relatives Risiko: 2,899). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Übertragung von Schwein auf den Menschen. Jedoch könnte auch ein Selektionsfehler bei der Auswahl der Kontrollgruppe zu einem solchen Ergebnis führen. Die Blutspendergruppe unterscheidet sich sicher nicht nur im Grad der Schweine-Exposition von Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern.

Der nicht signifikante Trend der Zunahme der Häufigkeit von Anti-HEV beim Schlachthauspersonal im Vergleich zur signifikant höheren Häufigkeit von Anti-HEV bei Schweinezüchtern könnte möglicherweise darin liegen, daß Schweinezüchter mehr und längere Zeit (den ganzen Tag über) exponiert sind als das Schlachthauspersonal. Wie erwähnt, treten akute HEV Infektionen hauptsächlich bei Schweinen auf die ein Alter von 2 bis 3 Monaten haben. So scheinen Schweinezüchter einen viel größeren Risiko an einer HEV-Infektion ausgesetzt zu sein als das Schlachthauspersonal.

Beim Vergleich der Häufigkeit Anti-HEV positiven Western Blot bei Schweinen, Blutspendern, Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern ergibt sich, daß Schweine signifikant häufiger Anti-HEV positiv sind als die drei untersuchten Personengruppen. ($p:<0.0001$ beim Vergleich Schweinen/Blutspendern und Schweinen/Schlachthauspersonal, $p: 0,0024$ beim Vergleich Schweinen/Schweinezüchtern; das Relative Risiko der Anti-HEV-Positivität beträgt im Vergleich Schweinen/Blutspendern 4,731, Schweinen/Schlachthauspersonal 3,261 und Schweinen/Schweinezüchtern 1,366). HEV-Infektionen erfolgen beim Schwein offensichtlich häufiger als beim Menschen, was vermuten läßt, daß Schweine ein Reservoir für HEV-Infektionen des Menschen sind.

Bei der Betrachtung der Dauer der Berufsausübung und des Alters der untersuchten Schweinezüchtern und des Schlachthauspersonals konnte festgestellt werden:

Beim Schlachthauspersonal ist ein nicht signifikanter Trend der Zunahme der Häufigkeit des Anti-HEV mit dem Alter ($p: 0,5725$ und Relatives Risiko: 1,207) und der Dauer der Berufstätigkeit ($p: 0,3925$ und Relatives Risiko: 1,283) vorhanden.

Bei den Schweinezüchtern ist ein nicht signifikanter Trend der Zunahme der Häufigkeit von Anti-HEV mit dem Alter ($p: 0, 5804$ und Relatives Risiko: 1,500)

aber keine Abhängigkeit von der Dauer der Berufsausübung vorhanden. Diese nicht signifikanten Trends stehen mit einer erhöhten HEV-Gefährdung von gegenüber Schweinen exponierten Personen im Einklang, können sie aber nicht beweisen. Vermutlich würde eine Vergrößerung der Untersuchungskollektive zu signifikanten Unterschieden führen. Eine fehlende Beziehung zwischen Anti-HEV-Prävalenz und Dauer der Berufsausübung bei Schweinezüchtern könnte durch eine limitierte Persistenz der Antikörper erklärt werden, da Anti-HEV nach einer Infektion oft nur kurzfristig nachweisbar sind. Bei etwa 80-90% der durch HEV-RNS-Nachweis gesicherten HEV-Hepatitis kann bereits nach wenigen Wochen, d.h. noch in der Rekonvaleszenz, der Anti-HEV-Test wieder negativ sein. Hier sollte auch die Tatsache erwähnt werden, daß in Griechenland die Schweinezuchtbetriebe meistens Familienbetriebe sind und somit ein enger Kontakt der Familienmitgliedern zu den Schweinen schon oft lange vor Beginn des beruflichen Kontakts besteht.

Bei den Anti-HEV-positiven Personen der drei untersuchten Gruppen unterscheidet sich die Häufigkeit der Antikörper gegen die verschiedenen HEV-Peptiden nicht signifikant.

Bei den Anti-HEV positiven Schweinen werden Antikörper gegen das O2N-Peptid signifikant häufiger gefunden als bei positiven Blutspendern ($p: 0,0006$) ebenso das O2C-Peptid ($p: 0,0095$); Während Antikörper gegen das O2M-Peptid nicht signifikant seltener gefunden werden ($p: 0.1620$). Prinzipiell scheint das Immunsystem des Schweins ähnliche HEV-Epitope zu erkennen wie das Immunsystem des Menschen. Graduelle Unterschiede scheinen aber vorhanden zu sein.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Untersuchung war die vergleichende Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen Hepatitis E Virus in Seren von Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schlachtschweine. Es wurden Blutproben von Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schlachtschweine, aus vier verschiedenen Provinzen in Nordgriechenland untersucht. Die Blutspenderproben, die als eine für die Wohnbevölkerung repräsentative Vergleichsgruppe dienen sollten, stammten von zwei Blutbanken in Thessaloniki. Alle Serumproben wurden im Max-von-Pettenkofer-Institut in München mit der Western Blot Methode auf Anti-HEV untersucht.

Die Anti-HEV-Prävalenz der Blutspender betrug 15,7%. Dies liegt weit über der 1996 in Griechenland in einer Studie festgestellten Rate von 2,2%. Der Unterschied ist am wahrscheinlichsten durch die Verwendung des empfindlicheren Western Blots in dieser Studie bedingt.

Die untersuchten Schweineseren waren zu 80% positiv auf Anti-HEV, was die Tatsache hervorhebt, daß auch in Griechenland, wie in vielen Ländern, ein sehr großer Anteil der Schweinepopulation mit dem HEV oder ein Schwein-HEV ähnliches Virus infiziert ist.

Schlachthauspersonal, 22,2% positiv, und Schweinezüchter, 40% positiv, Berufsgruppen mit engem beruflichen Kontakt zu Schweinen, wiesen im Vergleich zu Blutspendern eine signifikant höhere Anti-HEV Prävalenz bzw. einen Trend zur höheren Anti-HEV-Prävalenz auf. Dieses unterstützt die Hypothese einer erhöhten Gefahr der Personen mit engem beruflichen Kontakt zu Schweinen, sich mit dem HEV oder einem HEV-ähnlichen Virus zu infizieren. So stellt sich auch für Griechenland die Frage ob mindestens ein Teil der HEV-Infektionen des Menschen im Sinn einer Zoonose vom Schwein auf den Menschen übertragen werden.

Beim Schlachthauspersonal wurde ein nicht signifikanter Trend der Zunahme der Häufigkeit des Anti-HEV mit dem Alter und der Dauer der Berufstätigkeit festgestellt.

Bei den Schweinezüchtern ist ein nicht signifikanter Trend der Zunahme der Häufigkeit des Anti-HEV mit dem Alter aber nicht mit der Dauer der Berufstätigkeit vorhanden.

Sollten sich diese Trends in weiteren Untersuchungen bestätigen, so sprechen auch sie für eine HEV-Gefährdung beim Kontakt mit Schweinen.

Bei Schweinen können prinzipiell Antikörper gegen die gleichen HEV-Peptide im Western Blot nachgewiesen werden gegen die auch das Immunsystem des Menschen reagiert. Antikörper gegen das O2M- und das O2C-Peptid werden bei Anti-HEV-positiven Schweinen jedoch signifikant häufiger gesehen.

9. LITERATUR

Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S.R., Krawczynski, K. 2000; Duration and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet* 356:1081-2.

Aggarwal, R., Krawczynski, K. 2000; Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 15:9-20.

Alvarez-Munoz, M.T., Torres, J., Damasio, L., Gomez, A., Tapia-Conyer, R., Munoz, O. 1999; Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch Med Res May-Jun;30(3):251-4*

Arankalle, V.A., Joshi, M.V., Kulkarni, A.M., Gandhe, S.S., Chobe, L.P., Rautmare, S.S., Mishra, A.C., Padbidri, V.S. 2001; Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat May;8(3):223-7*

Arankalle, V. A., Goverdhan, M.K., and Banerjee, K. 1994; Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. *J. Viral Hepat.* 1:125–129.

Arankalle, V. A., M. S. Chada, S. A. Tsarev, S. U. Emerson, A. R. Risbud, K. Banerjee, and R. H. Purcell. 1994; Seroepidemiology of water-born hepatitis in India and evidence for a third enterically transmitted hepatitis agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3428-3432

Arankalle, V.A. et al. 1995; Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis* 171, 447-450

Arif M, Qattan I, al-Faleh F, Ramia S.1994; Epidemiology of hepatitis E virus (HEV) infection in Saudi Arabia. *Ann Trop Med Parasitol Apr;88(2):163-8*

Aubry P, Niel L, Niyongabo T, Kerguelen S, Larouze B. 1997; Seroprevalence of hepatitis E virus in an adult urban population from Burundi. *Am J Trop Med Hyg Sep;57(3):272-3*

Aye, T.T. et al. 1992; Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res* 20, 3512,

Bader, T., K. Krawczynski, L. Polish, and M. Favorov. 1991; Hepatitis E in a U.S. traveler to Mexico. *N. Engl. J. Med.* 325:1659. (Letter.)

Balayan, M. S. 1993 ; Hepatitis E virus infection in Europe: regional situation regarding laboratory diagnosis and epidemiology. *Clin. Diagn. Virol.* 1:1-9.

Balayan, M. S., A. G. Andjaparidze, S. S. Savinskaya, E. S. Ketiladze, D. M. Braginsky, A. P. Savinov, and V. F. Poleschuk. 1983; Evidence for a non-A non-B hepatitis transmitted via the fecal oral route. *Intervirology* 20:23-31

Balayan, M. S., P. K. Usmanov, N. A. Zamayatina, D. I. Djumalieva, and F. R. Karas. 1990; Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J. Med. Virol.* 32:58-59

Bartoloni A, Bartalesi F, Roselli M, Mantella A, Arce CC, Paradisi F, Hall AJ. 1999; Prevalence of antibodies against hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia *Trop Med Int Health* Sep;4(9):596-601.

Berke, T., and D. O. Matson. 2000; Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch. Virol.* 145:1421-1436

Bernal W, Smith HM, Williams R. 1996; A community prevalence study of antibodies to hepatitis A and E in inner-city London. *J Med Virol* Jul;49(3):230-4

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. 1965; A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191:541

Bradley DW. 1992; Hepatitis E: epidemiology, aetiology and molecular biology. *Med Virol* 2:19-28.

Bradley, D. et al. 1988; Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J Gen Virol* 69, 731-738

Bradley, D. W. 1990; Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 46:442-461

Bradley, D. W., K. Krawczynski, E. H. Cook, Jr., K. McCaustaland, C. D. Humphrey, J. E. Spelbring, H. Myint, and J. E. Maynard. 1987; Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passages of disease in cynomolgus macaques and tamarines and recovery of disease-associated 27-to 34-nm virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6277-6281

Bryan JP, Tsarev SA, Iqbal M, Ticehurst J, Emerson S, Ahmed A, Duncan J, Rafiqui AR, Malik IA, Purcell RH, et al. 1994; Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* Sep;170(3):517-21

Chandler, J. D., M. A. Riddell, F. Li, R. J. Love, and D. A. Anderson. 1999; Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet. Microbiol.* 68:95-105

Chapman, B. A., Burt, M. J., Wilkinson, I. D. & Schousboe, M. I. 1993; Community acquired viral hepatitis in New Zealand: a case of sporadic hepatitis E virus infection. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 23, 722-723

Chauhan, A. et al. 1993; Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 341, 149-150

Chow WC, Lee AS, Lim GK, Cheong WK, Chong R, Tan CK, Yap CK, Oon CJ, Ng HS. 1997; Acute viral hepatitis E: clinical and serologic studies in Singapore. *J Clin Gastroenterol* Jun;24(4):235-8

Christensen, J.C. 1995; Hepatitis A infection in children: Who is at risk? Symposium: New Developments in Hepatitis A Disease Prevention. San Antonio, November 19

Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, et al. 1995; Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 53:228-12.

Clayson, E. T., R. Snitbhan, M. Ngarmpochana, D. W. Vaughn, and M. P. Shresth. 1996; Evidence of the hepatitis E virus (HEV) is a zoonotic virus: detection of natural infections among swine, rats and chickens in an area endemic for human disease, p. 329-335. In Y. Busson, P. Coursaget, and M. Kane (ed.), Enterically transmitted hepatitis viruses. La Simarre, Joué-lès-Tours, France

Corwin AL, Tien NT, Bounlu K, Winarno J, Putri MP, Laras K, Larasati RP, Sukri N, Endy T, Sulaiman HA, Hyams KC. 1999; The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia Trans R Soc Trop Med Hyg May-Jun;93(3):255-60

Cruells MR, Mescia G, Gaibisso R, Ramirez M, Gutierrez M, Kohen S, Gonzalez M, Russi J, Chiparelli H, Ucar L, Perez MT. 1997; Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay Gastroenterol Hepatol Jun-Jul;20(6):295-8

Dainhardt T, Holmes A.W, CappsR.B, Popper H. 1967; Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmset monkeys. I Transmission of disease, serial passages and description of liver lesions. J Exp Med 125:673

Dane DS, Cameron CH, Briggs M 1970; Virus-like particles in serum of patients whith Australia-antigen associated hepatitis. Lancet 1:695

Dawson, G. J., I. K. Mushahwar, and K. H. Chau. 1992; Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in an U.S. traveler to Pakistan. Lancet 340:426-427.

Dawson, G. J., K. H. Chau, C. M. Cabal, P. O. Yarbough, G. R. Reye, and I. K. Mushahwar. 1992; Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. J. Virol. Methods 38:175-186

Drobeniuc, J, Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu.,A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B.H., Margolis, H.S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. J Infect Dis 2001 Dec 15;184(12):1594-7

Eppinger H 1940; Die akuten Leberparenchymerkrankungen. In Adam (Hrsg) Ein Querschnitt durch die neueste Medizin. Fischer, Jena

Erker, J. C., S. M. Desai, G. G. Schlauder, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar. 1999; A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. Gen. Virol.* 80:681-690

Feinstone, S.M., Kipikian, A.Z., Purcell, R.H. 1973; Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182: 1062

Favorov, M.O., Fields, H.A., Purdy, M.A., Yashina, T.L., Aleksandrov, A.G., Alter, M.J., Yaresheva, D.M., Brandley, D.W., Margolis, H.S. Serologic identification of hepatitis E virus infection in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36 (4): 246-250

Favorov, M. O., M. Y. Kosoy, S. A. Tsarev, J. E. Childs, and H. S. Margolis. 2000; Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 181:449-455

Favorov, M. O., O. Nazarova, and H. S. Margolis. 1998; Is hepatitis E an emerging zoonotic disease? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:242

Favorov, M. O., Y. E. Khudyakov, E. E. Mast, T. L. Yashina, C. N. Shapiro, N. S. Khudyakova, D. L. Jue, G. G. Onischenko, H. S. Margolis, and H. A. Fields. 1996; IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV specific artificial recombinant mosaic protein. *J. Med. Virol.* 50:50-58

Fix, A. D., M. Abdel-Hamid, R. H. Purcell, M. H. Shehata, F. Abdel-Aziz, N. Mikhail, H. El Sebai, M. Nafeh, M. Habib, R. R. Arthur, S. U. Emerson, and G. T. Strickland. 2000; Prevalence of antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62:519–523

Fricker, J. 1996; Hepatitis E vaccine. *Mol Med Today* 2, 137, ID:96389575

Froesner, G.G : Epidemiologie der Hepatitis A und E. In **Maas, G., Stueck, B.** 1994; (Hrsg): Virushepatitis A bis E–Diagnose, Therapie, Prophylaxe. KILIAN VERLAG, 18-29

Froesner, G.G.: Hepatitis A Virus. In **Belshe, R.B** (ed.): 1991; Textbook of human virology. 2nd ed. Mosby Year Book, St. Louis, 498-516

Froesner, G.G., Nitschko, H., Seebach, J., Roguniskaia, H. 1998; Klinische Bedeutung, Epidemiologie und Diagnostik der Hepatitis E. Der Bay. Int. 18 (5), 322-328

Froesner, G.G., Seebach, J., Kraemer, B. 1999; Hepatitis E Serodiagnostik mit einem neuen Western Blot auf der Basis rekombinanter Antigene HEV-Poster DGHM Regensburg

Froesner, G.G., Subburayalu, A., Nitschko, H., et al. 1998; High prevalence of hepatitis E related virus in German pigs, but no indication of transmission to humans. Poster auf dem Symposium “Progress in Clinical Virology IV” der “European Society for Clinical Virology”, 30.8-2.9. in Hamburg

Froesner, G.G., Subburayalu, A., Nitschko, H., et al. 1994; Rationelle Diagnostik der Hepatitis A und E. Labor-Medizin 17, 251

Froesner, G.G.,(Hg) 2001; Moderne Hepatitisdiagnostik. VERLAG IM KILIAN, Marburg 2. überarbeitete Auflage

Frölich, C.1879; Über Icterusepidemien. Dtsch Arch Klein Med 24:394

Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, Anderson DA, Benard HJ, Schroeder BA, Khudyakov YE, Fields HA, Croxson MC. 2001; Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. : J Med Virol Nov;65(3):525-9

Gonçales, N. S., J. R. Pinho, R. C. Moreira, C. P. Saraceni, A. M. Spina, R. B. Stucchi, A. D. Filho, L. A. Magna, and F. L. Goncales, Jr. 2000; Hepatitis E virus immunoglobulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:813-816

Gupta, H., Joshi, Y.K., Tandon, B.N. 1988; An enzym-linked immunassay for the possible detection of non-A, non-B viral antigen in patients with epidemic viral hepatitis. *Liver*; 8: 111-115

Halbur, P. G., C. Kasorndorkbua, C. Gilbert, D. Guenette, M. B. Potters, R. H. Purcell, S. U. Emerson, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2001; Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E virus recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* 39:918-923

Hamid, S. S., S. M. Jafri, H. Khan, H. Shah, H. Abbas, and Z. Fields. 1996; Fulminant hepatic failure in pregnant women: acute fatty liver or acute viral hepatitis? *Hepatology* 25:20-27.

Hau CH, Hien TT, Tien NT, Khiem HB, Sac PK, Nhung VT, Larasati RP, Laras K, Putri MP, Doss R, Hyams KC, Corwin AL. 1999; Prevalence of enteric hepatitis A and E viruses in the Mekong River delta region of Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* Feb;60(2):277-80

He,J., Tam,A.W., Yarbough, P.O., Reyes, G.R., Carl,M. 1993; Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative structural proteins expressend in insect cells. *J. Clin. Microbiol.* 31 (8): 2167-2173

Hsieh, S. Y., P. Y. Yang, Y. P. Ho, C. M. Chu, and Y. F. Liaw. 1998; Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J. Med. Virol.* 55:300-3

Hsieh, S. Y., X. J. Meng, Y. H. Wu, S. Liu, A. W. Tam, D. Lin, and Y. F. Liaw. 1999; Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* 37:3828-3834

Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. 2002; Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* Apr;40(4):1326-32

Huang RT, Li DR, Wei J, Huang XR, Yuan XT, Tian X. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J Gen Virol* 1992;73:1143-8.

Huang, C. C., D. Nguyen, J. Fernandez, K. Y. Yun, K. E. Fry, D. W. Bradley, A. W. Tam, and G. R. Reyes. 1992; Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191:550-558

Hussaini, S. H., S. J. Skidmore, P. Richardson, L. M. Sherratt, B. T. Cooper, and J. G. O'Grady. 1997; Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J. Viral Hepat.* 4:51-54

Ibarra H, Riedemann S, Reinhardt G, Frieck P, Siegel F, Toledo C, Calvo M, Froosner G. 1997; Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile *Rev Med Chil* 1997 Mar;125(3):275-8

Irani Hakime N, Feghali Haibeh R. 1998; Hepatitis E virus: detection of antibodies in blood donors in Lebanon *J Med Liban Mar-Apr*;46(2):60-2

Jameel, S., M. Zafrullah, M. H. Ozdener, and S. K. Panda. 1996; Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J. Virol.* 70:207-216

Jameel, S., M. 1999; Molecular biologie and pathogenesis of hepatitis E virus. *Exp. Rev. Mol. Med.* 6 December

Jardi, R., M. Buti, F. Rodriguez-Frias, and R. Esteban. 1993; Hepatitis E infection in acute sporadic hepatitis in Spain. *Lancet* 341:1355-1356.

Jehn 1885; Eine Ikterusepidemie in wahrscheinlichem Zusammenhang mit vorausgegangener Revaccination. *Dtsch Med Wochenschr* 11:339;354

Johansson, P. J., I. K. Mushahwar, G. Norkrans, O. Weiland, and E. Nordenfelt. 1995; Hepatitis E infection in patients with acute hepatitis non-A-D in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 27:543-546

Kabrane-Lazizi, Y., J. B. Fine, J. Elm, G. E. Glass, H. Higa, A. Diwan, C. J. Gibbs, X. J. Meng, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 1999; Evidence for widespread

infection of wild rats with the hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:331-335

Kabrane-Lazizi, Y., X. J. Meng, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1999; Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J. Virol.* 73:8848-8850

Karetnyi YV, Favorov MO, Khudyakova NS, Weiss P, Bar-Shani S, Handsheer R, Aboudy Y, Varsano N, Schwartz E, Levin E, et al. 1995; Serological evidence for hepatitis E virus infection in Israel. *J Med Virol* Mar;45(3):316-2

Karetnyi, Y. V., Dzhumalieva, D. I., Usmanov, R. K., Titova, I. P., Lituak, Y. A. & Balayan, M. S. 1993; Possible involvement of rodents in the spread of hepatitis E (in Russian). *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunology* 41, 52-56.

Karetnyi, Y. V., M. J. Gilchrist, and S. J. Naides. 1999; Hepatitis E virus infection prevalence among selected populations in Iowa. *J. Clin. Virol.* 14:51-55

Kasorndorkbua C, Halbur PG, Thomas PJ, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ. 2002; Use of a swine bioassay and a RT-PCR assay to assess the risk of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Virol Methods* Mar;101(1-2):71-8

Khuroo, M.S. et al. 1981; Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* 70, 252-255

Khuroo, M.S., Kamili, S. and Jameel, S. 1995; Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 345, 1025-1026

Knodler B, Hiller J, Loliger CC, Kuhn L. 1994; Hepatitis e antibodies in blood donors, hemodialysis patients and in normal people *Beitr InfusionstherTransfusionsmed*32:124-7

Koshy A, Grover S, Hyams KC, Shabrawy MA, Pacsa A, al-Nakib B, Zaidi SA, al-Anezi AA, al-Mufti S, Burans J, Carl M, Richards AL. 1996; Short-term IgM and IgG antibody responses to hepatitis E *Scand J Infect Dis* 28(5):439-41

Krawczynski, K. and Bradley, D.W. 1989; Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus- associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis* 159, 1042-1049

Kwo, P. Y., Schlauder, G. G., Carpenter, H. A., Murphy, P. J., Rosenblatt, J. E., Dawson, G. J., Mast, E. E., Krawczynski, K. & Balayan, V. 1997; Acute hepatitis E by a new isolate required in the United States. *Mayo Clinic Proceedings* 72, 1133-1136

Langer BC, Frosner GG, von Brunn A. 1997; Epidemiological study of viral hepatitis types A, B, C, D and E among Inuits in West Greenland *J Viral Hepat* Sep;4(5):339-49

Li, F., Zhuang, H., Kolivas, S., et al. 1994; Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by Western immunoblot using open reading frame 2 and 3 glutathione S-transferase fusion proteins. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2060

Lin CC, Wu JC, Chang TT, Chang WY, Yu ML, Tam AW, Wang SC, Huang YH, Chang FY, Lee SD. 2000; Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):3915-8

Luerman 1885; Eine Ikterusepidemie. *Berl Klein Wochenschr* 22:20

Mac Callum FO, Brandley WH. 1944; Transmission of infective hepatitis by the oral route. Effect of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2:228

Macedo G, Pinto T, Sarmiento JA, Vale AM, Ribeiro T. 1998; The first assessment of hepatitis E virus seroprevalence in northern Portugal *Acta Med Port* 1998 Dec;11(12):1065-8

Maneerat, Y., E. T. Clayson, K. S. Myint, G. D. Young, and B. L. Innis. 1996; Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 48:121-128

Mast, E. E., Kuramoto, I. K., Favorov, M. O., Shoening, V. R., Burkholder, B. T., Shapiro, C. N. & Holland, P. V. 1997; Prevalence of and risk factors for antibody to

hepatitis E virus seroreactivity among blood donors in northern California. *Journal of Infectious Diseases* 176, 34-40

Mateos, M. L., C. Camarero, E. Lasa, J. L. Teruel, N. Mir, and F. Baquero. 1998; Hepatitis E virus: relevance in blood donors and other risk groups. *Vox Sang.* 75:267-269

McCrudden, R., S. O'Connell, T. Farrant, S. Beaton, J. P. Iredale, and D. Fine. 2000; Sporadic acute hepatitis E in the United Kingdom: an underdiagnosed phenomenon? *Gut* 46:732-733

Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. 2002; Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* Jan;40(1):117-22

Meng, X. J., P. G. Halbur, J. S. Haynes, T. S. Tsareva, J. D. Bruna, R. L. Royer, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1998; Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* 143:1405-1415

Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1998; Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J. Virol.* 72:9714-9721

Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thaker, and S. U. Emerson. 1997; A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9860-9865

Meng, X. J., S. Dea, R. E. Engle, R. Friendship, Y. S. Lyoo, T. Sirinarumitr, K. Urairong, D. Wang, D. Wong, D. Yoo, Y. Zhang, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1999; Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J. Med. Virol.* 59:297-302

Miller, M.J. 1995; Viral taxonomy. Clin Infect Dis 21, 279-280

Moaven L, Van Asten M, Crofts N, Locarnini SA. 1995; Seroepidemiology of hepatitis E in selected Australian populations. J Med Virol 1995 Mar;45(3):326-30

Mosley JW 1972; Viral hepatitis: a group of epidemiologic entities. CMA Journal 106 (Special Issue):42

Mushahwar, I. K., and G. J. Dawson. 1997; Hepatitis E virus: epidemiology, molecular biology and diagnosis, p. 33-43. In T. J. Harrison, and A. J. Zuckerman (ed.), The molecular medicine of viral hepatitis. John Wiley

Naik, S.R., Aggarwal, R., Salunke, P.N., Mehrotra, N.N. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. Bull. World Health Organ. 1992; 70 (5): 597-604 & Sons, Inc., New York, N.Y.

Nanda, S.K. et al. 1994; Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. J Med Virol 42, 237-240,

Nanda, S.K. et al. 1995; Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. Gastroenterology 108, 225-230

Nubling M, Hofmann F, Tiller FW. 2002; Occupational risk for hepatitis A and hepatitis E among health care professionals? Infection Apr;30(2):94-7

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. 2001; Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. Biochem Biophys Res Commun Dec 21;289(5):929-36

Ooi WW, Gawoski JM, Yarbough PO, Pankey GA. 1999; Hepatitis E seroconversion in United States travelers abroad. Am J Trop Med Hyg Nov;61(5):822-4

Panda, S.K. and Jameel, S. 1997; Hepatitis E virus: from epidemiology to molecular biology. Vir Hep Rev 3, 227-251

Panda, S.K. et al. 1995; An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J Clin Microbiol* 33, 2653-2659,

Parana R, Cotrim HP, Cortey-Boennec ML, Trepo C, Lyra L. 1997; Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* Jul;57(1):60-1

Paul, D. A., M. F. Knigge, A. Ritter, R. Gutierrez, T. Pilot-Matias, K. H. Chau, and G. J. Dawson. 1994; Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion protein and synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 169:801-806

Pavia M, Iiritano E, Veratti MA, Angelillo IF.1998; Prevalence of hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. *Infection* Jan-Feb;26(1):32-5

Paul, D. A., M. F. Knigge, A. Ritter, R. Gutierrez, T. Pilot-Matias, K. H. Chau, and G. J. Dawson. 1994; Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion protein and synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 169:801-806

Poel van der, W.H.M.,Vershoor, F., Heide van der, R., et al. 2001 Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 7:970-976.

Psichogiou, M., E. Vaindirili, E. Tzala, S. Voudiclari, J. Boletis, G. Vosnidis, S. Moutafis, G. Skoutelis, V. Hadjiconstantinou, H. Troonen, and A. Hatzakis. 1996; Hepatitis E virus (HEV) infection in haemodialysis patients. The multicentre haemodialysis cohort study in viral hepatitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11:1093-1095

Purcell, R. H. 1996; Hepatitis E virus, p. 2831-2843. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Purcell, R.H. and Ticehurst, J.R. 1997; Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: epidemiology and clinical characteristics. In *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Zuckerman, A.J., ed.), pp. 131-137, Allan R Liss Press, New York, USA

Purdy, M.A. et al. 1993; Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the 'alpha-like' RNA virus supergroup. *Semin Virol* 4, 319-326

Queiros L, Condeco J, Tender A, Mateus M, Teixeira A, Pascoal H.1997; The seroprevalence for hepatitis E viral antibodies in the northern region of Portugal (among the donor population) *Acta Med Port Jun-Jul;10(6-7):447-53*

Reyes, G. R., M. A. Purdey, J. P. Kim, K. C. Luk, L. M. Young, K. E. Fry, and D. W. Bradley. 1990; Isolation of a cDNA from the virus responsible for the enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247:1335-1339

Reyes, G. R., Huang, C. C., Tam, A. W. & Purdy, M. A. 1993; Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Archives of Virology* 7, 15-29.

Reyes, G. R. 1997; Overview of the epidemiology and biology of the hepatitis E virus, p. 239-258. In R. A. Willsen (ed.), *Viral hepatitis*. Marcel Dekker, Inc, New York, N.Y

Ritter, A., Witteler, H., Simpson, B. et al. 1993; A multi-centre study of HEV seropositivity in random blood donors. *J. Hepatol.*; 18 (Suppl. 1):S25

Rizetto,M., Canese,M.G., Arico,S. et al. 1977; Immunfluorescence detection of a new antigen/antibody system (delta-antidelta) associated with the hepatitis B virus in the liver and in the serum of HBsAg carriers. *Gut* 18, 997-1003

Rizetto,M., Hoyer,R., Canese,M.G. et al. 1990a; Delta antigen the association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and ribonucleic acid in the serum of delta infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6124-6128

Robinson, R.A. et al. 1998; Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 12, 75-84

Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K. 1993; Viraemia in Egyptian children with hepatitis E virus infection. *Lancet* ; 341 (8841): 378

Schlauder, G. G., G. J. Dawson, J. C. Erker, P. Y. Kwo, M. F. Knigge, D. L. Smalley, D. L. Rosenblatt, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. 1998; The sequence

and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J. Gen. Virol.* 79:447-456

Schlauder, G. G., S. M. Desai, A. R. Zanetti, N. C. Tassopoulos, and I. K. Mushahwar. 1999; Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J. Med. Virol.* 57:243-251

Schlauder, G. G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G. C. & Mushahwar, I. K. 2000; Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *Journal of Infectious Diseases* 182, 294-297

Schlauder GG, Mushahwar IK. 2001; Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* Oct;65(2):282-92

Seow HF, Mahomed NM, Mak JW, Riddell MA, Li F, Anderson DA. 1999; Seroprevalence of antibodies to hepatitis E virus in the normal blood donor population and two aboriginal communities in Malaysia. *J Med Virol* Oct;59(2):164-8

Skaug K, Hagen IJ, von der Lippe B. 1994; Three cases of acute hepatitis E virus infection imported into Norway. *Scand J Infect Dis* 26(2):137-9

Skidmore, S. J., P. O. Yarbough, K. A. Gabor, A. W. Tam, and G. R. Reyes. 1991; Imported hepatitis E in UK. *Lancet* 337:1541

Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E. & Reyes, G. R. 1991; Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120-131

Tam, A. W., R. White, E. Reed, M. Short, Y. Zhang, T. R. Fuerst, and R. E. Lanford. 1996. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215:1-9

Tam, A. W., R. White, P. O. Yarbough, B. J. Murphy, C. P. McAtee, R. E. Lanford, and T. R. Fuerst. 1997; In vitro infection and replication of the hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238:94-102

Tanaka E, Takeda N, Tian-Chen L, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura T, Kiyosawa K. 2001; Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J Gastroenterol* May;36(5):317-21

Tarrago D, Lopez-Velez R, Turrientes C, Baquero F, Mateos ML. 2000; Prevalence of hepatitis E antibodies in immigrants from developing countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Apr;19(4):309-11

The International Committee on Taxonomy of Viruses 8th report

Thomas, D. L., P. O. Yarbough, D. Vlahov, S. A. Tsarev, K. E. Nelson, A. J. Saah, and R. H. Purcell. 1997; Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J. Clin. Microbiol.* 35:1244-1247 *Med Virol* Feb;42(2):124-8

Tien, N. T., H. T. Clayson, H. B. Khiem, P. K. Sac, A. L. Corwin, and K. S. Myint. 1997; Detection of immunoglobulin G to the hepatitis E virus among several animal species in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57:211.

Torresi, J. et al. 1999; Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol* 80, 1185-1188

Tsarev, S. A., M. P. Shrestha, J. He, R. M. Scott, D. W. Vaughn, E. T. Clayson, S. Gigliotti, C. F. Longer, and B. L. Innis. 1998; Naturally acquired hepatitis E virus (HEV) infection in Nepalese rodents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:242.

Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, A. Z. Kapikian, J. Ticehurst, W. London, and R. H. Purcell. 1993; ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J. Infect. Dis.* 168:369-378

Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, M. K. Rippy, P. Zack, M. Shapiro, and R. H. Purcell. 1995; Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J. Infect. Dis.* 172:31-37

Tsarev, S. A., S. U. Emerson, G. R. Reyes, T. S. Tsareva, L. J. Legters, I. A. Malik, M. Iqbal, and R. H. Purcell. 1992; Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:559-563

Tucker TJ, Kirsch RE, Louw SJ, Isaacs S, Kannemeyer J, Robson SC. 1996; Hepatitis E in South Africa: evidence for sporadic spread and increased seroprevalence in rural areas. *J Med Virol* 1996 Oct;50(2):117-9

Uchida, T., Susuki, K., Iida, F., Shikata, T., M., Rikihisa, T., Mizuno, K., Soe, S., Win, K.M., Nakane, K. Occurrence and character of a putative causative virus of enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis in bile. *Jpn. J. Exp. Med.* 1990; 60 (1): 23-29

Virchow, R. 1865; Über das Vorkommen und den Nachweis des hepatogenen, insbesondere des katarrhalischen Icterus. *Arch Pathol Anatom Physiol Klin Med* 32:117

Voegt, H. 1942; Zur Ätiologie der Hepatitis Epidemica. *Münch Med Wochenschr* 89:76

Wang, Y., R. Ling, J. C. Erker, H. Zhang, H. Li, S. Desai, I. K. Mushahwar, and T. J. Harrison. 1999; A divergent genotype of the hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 80:169-177

Wang, Y., Zhang, H., Ling, R., Li, H. & Harrison, T. J. 2000; The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *Journal of General Virology* 81, 1675-1686.

Worm, H. C., Wurzer, H. & Frösner, G. 1998; Sporadic hepatitis E in Austria [letter]. *New England Journal of Medicine* 339, 1554-1555

Worm, H.C, George G. Schlauder, Herbert Wurzer and Isa K. Mushahwar 2000; Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis *Journal of General Virology* 81, 2885-2890.

Worm, H.C., Wurzer, H., Froesner, G.G. Von Brunn, A., Seebach, J., Thyagarajan, S.P., et al. 1998; PCR amplification, cloning: Sporadic hepatitis E in Austria. *N. Engl. J. Med.* 339, 1554

Wu JC, Chen CM, Chiang TY, Tsai WH, Jeng WJ, Sheen IJ, Lin CC, Meng XJ. 2002; Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J Med Virol* Apr;66(4):488-92

Wu, J. C., C. M. Chen, T. Y. Chiang, I. J. Sheen, J. Y. Chen, W. H. Tsai, Y. H. Huang, and S. D. Lee. 2000; Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 60:166-171

Wu, J. C., I. J. Sheen, T. Y. Chiang, W. Y. Sheng, Y. J. Wang, C. Y. Chan, and S. D. Lee. 1998; The impact of traveling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: epidemiological and molecular analysis. *Hepatology* 27:1415-1420

Yarbough, P. O., A. W. Tam, K. E. Fry, I. K. Krawczynski, K. A. McCaustland, D. W. Bradley, and G. R. Reyes. 1991; Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* 65:5790-5797

Yoo D, Willson P, Pei Y, Hayes MA, Deckert A, Dewey CE, Friendship RM, Yoon Y, Gottschalk M, Yason C, Giulivi A. 2001; Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* Nov;8(6):1213-9

Yoo, D., and A. Giulivi. 2000; Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can. J. Vet. Res.* 64:193-203

Zaaijer, H. L., E. P. Mauser-Bunschoten, J. H. Ten Veen, H. P. Kapprell, M. Kok, and H. M. Van den Berg. 1995; Hepatitis E virus antibodies among patients with hemophilia, blood donors, and hepatitis patients. *J. Med. Virol.* 46:244-246

Zafrullah, M. et al. 1999; Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* 73, 4074-4082

Zafrullah, M., M. H. Ozdener, S. K. Panda, and S. Jameel. 1997; The ORF 3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* 71:9045-9053

Zanetti, A. R., and G. J. Dawson. 1994; Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study group of hepatitis E. *J. Med. Virol.* 42:318-320

Zanetti, A. R., G. G. Schlauder, L. Romano, E. Tanzi, P. Fabris, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar. 1999; Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.* 57:356-360

Synonym verwendete Abkürzungen und Fachbegriffe

Ab	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
Anti HBc	Antikörper gegen Hepatitis B Virus-„core“(-Kern)-Antigen
Anti HBs	Antikörper gegen Hepatitis B Virus-„surface“-(Oberflächen-) Antigene
Anti HEV	Antikörper gegen Hepatitis E Virus Antigene
Asn	Asparagin
bzw.	beziehungsweise
c DNS	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
d.h.	das heisst
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ELISA	enzym-linked immuno sorbent assay
et al.	et altera, und Mitarbeiter
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hepatitis A
HAV	Hepatitis A
HB	Hepatitis B
HBcAg	Hepatitis B “core” (-Kern)-Antigen
HBeAg	Hepatitis B “e” Antigen
HBsAg	Hepatitis B Antigen
HBV	Hepatitis B
HC	Hepatitis C
HCV	Hepatitis D
HD	Hepatitis D
HDAg	Hepatitis D Antigen
HDV	Hepatitis E
HE	Hepatitis E
HEV	Hepatitis C

HEV Ag	Hepatitis E Antigen
HEV-RNS	Hepatitis E Virus Ribonukleinsäure
HIV	Human Immundeficiency Virus
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgM	Immunglobuline der Klasse M
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
ml	Milliliter
N	Stickstoff
NANB	Non-A- non-B
nm	Nanometer
nsP	non structural protein (nichtstrukturelles Protein)
ORF	open reading frame
P	Prüfgröße zur Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanz-Wert)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
RNS	Ribonukleinsäure
rt-PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion nach reverser Transkription
UTRs	untranslated regions (nichtübersetzte Regionen)
VLP	Virus-like-particle
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
γ -GT	γ -Glutamyl-Transferase

Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1.1.1: Infektionsbedingte, nicht-virale Hepatitis-Ursachen

Abbild 2.1: Hochendemieregionen der Hepatitis E

Abbild. 2.2.1.1: Elektronenmikroskopische Abbildung des menschlichen Hepatitis E Virus

Abbildung 2.2.1.2: Klassifizierung des HEV

Abbild 2.2.2: Genom-Organisation des Hepatitis E Virus

Abbild 2.2.3: Ein vorgeschlagenes Modell für die Replikation des Hepatitis E Virus

Abbild. 2.2.5 : Auftreten der Gruppen der HEV-Isolaten weltweit

Abbild 2.2.4: Phylogenetische Verwandtschaft der HEV-Isolaten von Mensch und Schwein basiert auf der Sequenz eines 304 Nukleotide langen Stücks des ORF2

Abbildung 3.2.1: Zeitpunkt des Auftretens und typischer Verlauf virusspezifischer Marker bei der Hepatitis E

Abbildung: 3.3.1: Diagnostisches Vorgehen beim Nachweis einer akuten oder abgelaufenen HEV-Infektion

Abbildung 5.1: Landkarte von Griechenland

Abbildung 5.2.1.1: Lokalisation und Anordnung der offenen Leserahmen (ORFs) des HEV und die für den Western Blot exprimierten HEV-Peptide des ORF2 und ORF3

Tabelle 5.2.3.1: Bandenintensität – Auswertung

Abbild. 5.2.3.2: Teststreifen von bearbeiteten Serumproben dieser Arbeit

Tabelle 6.1.1.1: Häufigkeit Anti-HEV-IgG-positive Western Blots bei 108 Blutspendern, 72 Personen des Schlachthauspersonals und 15 Schweinezüchtern

Tabelle 6.1.2.1: Häufigkeit der einzelnen ORF Banden der bei Anti-HEV Western Blots von Blutspendern, Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

Abbildung 6.1.2.2: Grafische Darstellung der Häufigkeit der einzelnen ORF Banden bei Blutspendern (BS), Schlachthauspersonal (SP) und Schweinezüchtern (SZ) mit Anti-HEV-positiven Western Blot.

Tabelle 6.2.1.1: Ergebnis der Western Blot-Untersuchung auf Anti-HEV bei Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schweinen

Abbildung 6.2.1.2: Grafische Darstellung der Häufigkeit positiver Western Blots bei Blutspendern (BS), Schlachthauspersonal (SP), Schweinezüchtern (SZ) und Schweinen (SW)

Tabelle 6.2.2.1: Häufigkeit des Nachweises einzelner Banden bei 76 Schweinen mit positivem Western Blot auf Anti-HEV

Abbildung 6.2.2.2: Grafische Darstellung der Häufigkeit des Nachweises einzelner Banden bei 76 Schweinen (SW) mit positivem Western Blot auf Anti-HEV

Tabelle 6.2.3.1: Häufigkeit einzelner Banden bei Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schweinen mit positivem Western Blot auf Anti-HEV

Abbildung 6.2.3.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit einzelner Banden bei Blutspendern, Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schweinen mit positivem Western Blot auf Anti-HEV

Tabelle 6.3.1.1: Altersverteilung beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern

Tabelle 6.3.2.1: von Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern. Häufigkeit positiver Western Blots in zwei Altersgruppen

Abbildung 6.3.1: Grafische Darstellung der Häufigkeit positiver Western Blots in zwei Altersgruppen von Schlachthauspersonal (SP) und den Schweinezüchtern (SZ)

Tabelle 6.4.1.1: Dauer der Berufstätigkeit von Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern

Tabelle 6.4.2.1: Berufsjahrevertelung bei Anti-HEV-positivem Western Blot
beim Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern

Tabelle 6.4.2.2: Häufigkeit von Anti-HEV bei Schlachthauspersonal und
Schweinezüchtern in Abhängigkeit zur Dauer der Berufstätigkeit

Abbildung 6.4.2.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit von Anti-HEV bei
Schlachthauspersonal und Schweinezüchtern in Abhängigkeit zur
Dauer der Berufstätigkeit

Tabelle: 6.4.2.1: Häufigkeit von Antikörpern gegen die HEV-Teilproteine O2N,
O2C, O2M und O3 in Anti-HEV-positiven Seren von Blutspendern,
Schlachthauspersonal, Schweinezüchtern und Schweinen

Danksagung

Herrn Prof. Frösner möchte ich nicht nur für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danken, sondern auch für seine Hilfsbereitschaft. Durch seine Hilfsbereitschaft ist die Entfernung zwischen Thessaloniki-München erloschen worden. Frau Judith Seebach gilt mein besonderer Dank nicht nur für die Bearbeitung der Proben für diese Arbeit, sondern auch für ihre Freundlichkeit. Herrn Dr. Lachner, Leiter der Medizinischen Bibliothek, bin ich für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft einen Dank schuldig.

Viele haben mit ihrer Hilfe zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Vor allem fühle ich mich verpflichtet das Schlachthauspersonal und den Schweinezüchtern für ihre Mitarbeit, die die Basis dieser Arbeit war, zu danken. Weiter möchte ich Herrn Papadimas Christos, Herrn Dr. Tontis Dimitris, Herrn Papathanasiu Kostas, Herrn Badanis Christos danken. Meinen Vetter Siochos Michael und meine Freundin Konstandinidu Magda möchte ich besonders herzlich danken.

Ein Dankesausdruck ist für meine sehr liebe Freundin Elefteriadu Tania sehr wenig. Sie zeigte noch einmal, wie immer in ihrem ganzen Leben, ihre zu beneidenswerte Hilfsbereitschaft. Ihre Hilfe machte für mich vieles einfacher.

Meinen Freund Skandalis Georgios gilt mein besonderer Dank für seine große Hilfe während der ganzen und besonders der letzten Zeit der Erstellung der Arbeit.

Meinem Mann Dimitris danke ich besonders für seine Hilfe bei der Probengewinnung. Während eine Woche sind wir mehrere hundert Kilometer von früh morgens bis spät am Abend, quer durch Zentral-Mazedonien gefahren.

Ich weis, daß meine allerliebste Schwester Anna keinen Dankenausdruck verlangt für all das was sie für mich getan hat. Trotzdem aber danke ich sie für ihre besondere Liebe und Unterstützung, die nur sie mir geben kann. Ihre Liebe und Unterstützung haben mich nicht nur während der ganzen Zeit der Erstellung dieser Arbeit, sondern überhaupt in meinem ganzen Leben begleitet. Ich hoffe sie gibt mir die Gelegenheit mich zu revanchieren.

Als letztes möchte ich mich an meinem Sohn Fotis zuwenden. Die Zeit während der Erstellung dieser Arbeit war schwer, besonders für sein 14jähriges Alter. Ich bin mir sicher, er weiß, daß ich immer für ihn da sein werde, daß er das Liebste und Wichtigste in mein Leben ist. Mögen seine Wünsche und Träume für seine Zukunft wahr werden. Er ist es wert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Siochu
Vorname:	Asimula
Geburtsdatum:	6. Oktober 1958
Geburtsort:	Karion/Thesprotia/Griechenland
Staatsangehörigkeit:	griechisch
Eltern:	Siochos Evangelos Siochu Stawrula
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	Sohn: Fotis Baldumis-Siochos

Schulbildung

1964–1970:	Besuch der Grundschule
1970–1976:	Besuch des Griechischen Gymnasiums in München
1976:	Abitur

Studium

1976-1977:	Studienkolleg München
1977-1983:	Medizinstudium an der LMU
November 1983:	Approbation
1985–1990:	Angestellt bei einer Landarztpraxis in Griechenland
1991–1995:	Facharztausbildung in der Mikrobiologie und Klinische Biochemie im Universitäts- Krankenhaus A.C.H.E.P.A. in Thessaloniki
Seit 1996:	Praxis in Thessaloniki/Griechenland